

***Belastungsinduzierte Veränderungen
von Thrombozyten
-
Labormethodische Aspekte***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor philosophiae (Dr. phil.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Sozial- und Verhaltenswissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Volker Schmidt
geboren am 26. Juli 1972 in Meersburg a. B.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. phil. Thomas Hilberg
2. Prof. Dr. med. Holger H. W. Gabriel
3. PD Dr. med. Wolfgang Lösche

Tag des Kolloquiums: 18.12.2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 5 |
| 1.1 GRUNDLAGEN | 7 |
| 1.1.1 <i>Morphologie der Thrombozyten</i> | 11 |
| 1.1.2 <i>Funktion der Thrombozyten</i> | 13 |
| 1.2 THROMBOZYTEN UND KÖRPERLICHE BELASTUNG | 17 |
| 2 FRAGESTELLUNG | 25 |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 3.1 EINGANGSUNTERSUCHUNG..... | 26 |
| 3.2 BELASTUNGSUNTERSUCHUNGEN | 28 |
| 3.2.1 <i>Teilstudie I - Stufentestverfahren</i> | 28 |
| 3.2.2 <i>Teilstudie II - Dauertest</i> | 30 |
| 3.2.3 <i>Teilstudie III - Kurzzeitbelastung</i> | 31 |
| 3.3 PROBANDENDATEN..... | 33 |
| 3.4 PROBENGEWINNUNG UND ALLGEMEINE LABORMETHODEN | 35 |
| 3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE..... | 37 |
| 3.5.1 <i>Teilstudie I – Messung von Thrombozytenaktivität und -reaktivität</i> | 40 |
| 3.5.2 <i>Teilstudie II – Thrombozyten-Leukozyten Konjugate</i> | 46 |
| 3.5.3 <i>Teilstudie III – Differenzierung von Konjugaten</i> | 49 |
| 3.6 AUSWERTUNG UND STATISTIK | 52 |
| 4 ERGEBNISSE | 54 |
| 4.1 TEILSTUDIE I – STUFENTESTVERFAHREN | 54 |
| 4.1.1 <i>Ergometriedaten</i> | 54 |
| 4.1.2 <i>Thrombozytenzahl und -größe</i> | 55 |
| 4.1.3 <i>Thrombozytenaktivität und -reaktivität</i> | 56 |
| 4.2 TEILSTUDIE II – DAUERTEST | 66 |
| 4.2.1 <i>Ergometriedaten</i> | 66 |
| 4.2.2 <i>Blutbildveränderungen</i> | 66 |
| 4.2.3 <i>Thrombozytenaktivität und -reaktivität</i> | 67 |
| 4.2.4 <i>Thrombozyten-Leukozyten Konjugate</i> | 68 |
| 4.3 TEILSTUDIE III - KURZZEITBELASTUNG | 71 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1 Ergometriedaten..... | 71 |
| 4.3.2 Blutbildveränderungen..... | 72 |
| 4.3.3 Thrombozytenaktivität und -reaktivität | 73 |
| 4.3.4 Thrombozyten-Leukozyten Konjugate | 75 |
| 5 DISKUSSION | 79 |
| 5.1 DIE BELASTUNGSINDUZIERTER THROMBOZYTÖSE..... | 79 |
| 5.2 THROMBOZYTENAKTIVITÄT UND REAKTIVITÄT – METHODISCHE ASPEKTE..... | 80 |
| 5.2.1 Methodenkritik Probenaufbereitung | 80 |
| 5.2.2 Auswirkungen der Fixierung..... | 82 |
| 5.2.3 Probenstabilität..... | 86 |
| 5.2.4 Stimulationsversuche..... | 89 |
| 5.2.5 Reliabilität..... | 90 |
| 5.3 THROMBOZYTENAKTIVITÄT UND REAKTIVITÄT – KÖRPERLICHE BELASTUNG..... | 90 |
| 5.4 THROMBOZYTEN-LEUKOZYTEN KONJUGATE – METHODISCHE ASPEKTE..... | 97 |
| 5.5 THROMBOZYTEN-LEUKOZYTEN KONJUGATE – KÖRPERLICHE BELASTUNG..... | 102 |
| 5.6 AUSBLICK..... | 106 |
| 6 ZUSAMMENFASSUNG | 110 |
| LITERATURLISTE | 113 |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 134 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 136 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 137 |
| ANHANG..... | 138 |
| EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 185 |
| LEBENS LAUF: | 186 |
| DANKSAGUNG..... | 187 |

1 Einleitung

Der Anblick von Blut oder einer größeren Blutung löst bei vielen Menschen heftiges Erschrecken aus, denn jede größere Blutung gefährdet unmittelbar das Leben. Diese Alarmreaktion erfasst sowohl den Betroffenen als auch seine Umgebung. Nicht selten führt sie bei einigen Menschen zu Panik oder Bewusstseinsverlust in Form einer Ohnmacht.

Durch seine Versorgungsleistung sichert das Blut Funktion und Überleben der anderen Körperorgane. Damit nicht schon kleine Wunden zu einem erheblichen Blutverlust führen, hat der Körper Strategien entwickelt, sich vor einem allzu großen Verlust zu schützen. Ganz im Vordergrund steht dabei die Eigenschaft des Blutes, bei Kontakt mit fremden Oberflächen zu gerinnen und so einen möglichen Schaden im Gefäßbett des Kreislaufs abzudichten. Diese Aufgabe wird durch eine im Blutplasma enthaltene Kaskade von Gerinnungsfaktoren und von Thrombozyten erfüllt – kernlosen Zellen, die aufgrund ihrer im Ruhezustand diskusförmigen Gestalt auch als Blutplättchen bezeichnet werden.

Während aus einem Mangel oder einer Funktionsstörung der Thrombozyten (104, 106, 130, 140) sowie der Gerinnungsfaktoren (31, 248) eine Blutungsneigung resultiert, führt eine erhöhte Gerinnungsneigung zu thrombotischen Einengungen oder Verschlüssen von Blutgefäßen. Daraus resultiert eine Verminderung oder gar ein Ausfall der Durchblutung mit dem klinischen Bild eines Infarktes des betreffenden Organs. Liegt einer venösen Thrombose häufig eine Störung in der Kontrolle der plasmatischen Gerinnung zu Grunde, so führt eine gesteigerte Aktivität der Blutplättchen bevorzugt zu arteriellen Gefäßverschlüssen (4, 169).

Dabei erweist sich ein erhöhtes Aktivitätsniveau der Thrombozyten in doppelter Hinsicht als bedeutsam. Einerseits wird den Oberflächeneigenschaften und den Sekretionsprodukten von aktivierten Thrombozyten eine wichtige Beteiligung an der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques zugeschrieben (103, 132, 282, 306, 350). Andererseits führt im akuten Ereignis die lokale Adhäsion und Aggregation von aktivierten Blutplättchen am Ort einer Plaqueruptur zum thrombotischen Verschluss des betroffenen Blutgefäßes (54, 80, 104, 186, 306). Eine gesteigerte Aktivität der Thrombozyten findet sich u.a. im Rahmen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (184, 275), bei Schlaganfällen (112, 158, 230) oder transitorischen ischämischen Attacken (355), bei Diabetes mellitus und seinen Folgeerkrankungen (165, 272, 312, 325), bei Fettstoffwechselstörungen (59), bei einer koronaren Herzkrankheit (11, 38, 85, 94, 329) oder einem Myokardinfarkt (84, 95, 298, 323, 326), sowie teilweise unter akuter körperlicher Belastung (170, 233, 234, 280).

Während epidemiologische Untersuchungen ein vermindertes Risiko für kardiale Ereignisse bei Menschen mit regelmäßiger körperlicher Aktivität belegen (252, 253, 261), geht eine

intensive körperliche Belastung mit einem erhöhten Infarktrisiko für alle diejenigen einher, die sonst einen körperlich wenig aktiven Lebensstil pflegen und zumeist das vierzigste Lebensjahr überschritten haben (83, 96, 120, 307, 330). Als mögliche Ursache für das gesteigerte Infarktrisiko wurde ergänzend zur Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque (120) wiederholt eine unter körperlicher Belastung erhöhte Thrombozytenaktivität beschrieben (68, 141, 149, 188, 194, 231, 352). In diesem Sinne fanden bereits 1980 GREEN et al. (113) bei elf von zwanzig Patienten, die während eines standardisierten Belastungselektrokardiogramms eindeutige Zeichen einer Myokardischämie aufwiesen, einen deutlichen Anstieg der Plättchenaktivität, während achtzehn von zwanzig Patienten ohne entsprechende Ischämiezeichen keine Veränderungen der Plättchenaktivität zeigten. Ebenso beobachteten METHA und METHA (215) sowie ROTMENSCH et al. (286) einen Zusammenhang zwischen belastungsinduzierter Myokardischämie und einem Anstieg der Plättchenaktivität. Im Gegensatz dazu beschrieben MATHIS et al. (210) und HUGHES et al. (148) bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit und einer belastungsabhängigen Ischämie keine entsprechende Zunahme in der Aktivität von Thrombozyten, wenngleich die Aktivitätswerte der Patientengruppe schon in Ruhe signifikant gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe erhöht waren (148).

Widersprüchliche Ergebnisse für die Reaktion der Thrombozyten auf körperliche Belastung werden auch für den Vergleich zwischen Koronarpatienten und gesunden Normalpersonen berichtet. So zeigte sich in einer Belastungsuntersuchung von LEVITES & HAFT (194) eine gesteigerte Plättchenaktivität nach Belastung nur in der Patientengruppe, während eine entsprechende Veränderung in der gesunden Kontrollgruppe ausblieb. Im Gegensatz dazu beschrieben STRATTON et al. (313) einen hochsignifikanten Aktivitätsanstieg nur in der Kontrollgruppe bei kaum veränderter Aktivität unter den Patienten. Auch SCHERNTHANER et al. fanden eine Zunahme der Plättchenaktivität nur in der gesunden Kontrollgruppe, nicht jedoch unter Koronarpatienten. Ein Zusammenhang zwischen belastungsinduzierter Myokardischämie und thrombozytärer Aktivität ergab sich nicht (291).

Für gesunde Normalpersonen weist die überwiegende Mehrzahl der Untersuchungen zwar auf einen Anstieg der Plättchenaktivität unter körperlicher Belastung hin (33, 71, 73), doch fanden beispielsweise MANT et al. (208) keine Veränderungen in der Plättchenaktivität nach einem maximalen Stufentest auf dem Fahrradergometer. Andere Autoren berichten sogar von einem Rückgang der Aktivität (21, 180, 337). In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2005 können EL-SAYED et al. nur die weiterhin widersprüchlichen Studienergebnisse gegenüberstellen (74). Als mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Ergebnisse werden unter anderem methodische Probleme wie beispielsweise die Art der Blutentnahme, verschiedene

Methoden in der Bestimmung der Thrombozytenaktivität, eine artifizielle Aktivierung *in vitro* oder unterschiedliche Belastungsintensitäten diskutiert. (73, 208).

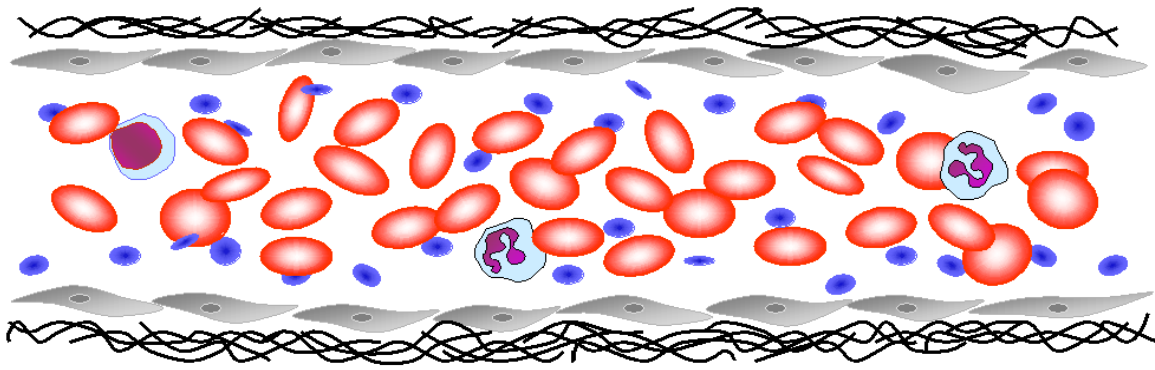
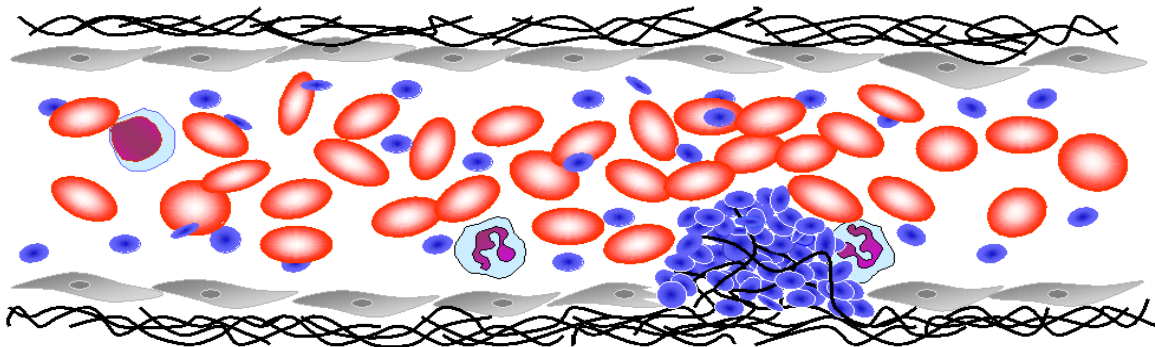
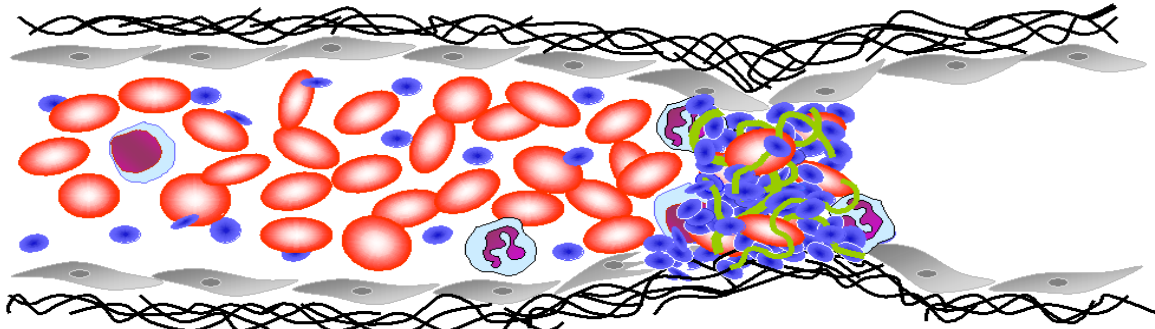
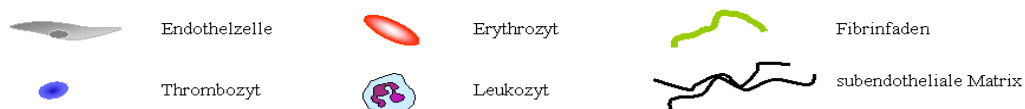
Zum besseren Verständnis des Einflusses von körperlicher Belastung auf das Verhalten der Thrombozyten sollen im Folgenden kurz Aufbau und Funktion der Thrombozyten skizziert werden. Als wesentlicher Bestandteil der Blutgerinnung gelingt eine sinnvolle Darstellung der Thrombozytenfunktion nur unter Bezug auf den allgemeinen Gerinnungsablauf.

1.1 Grundlagen

Im unverletzten Zustand durchströmt das Blut ein geschlossenes Gefäßbett. Die innere Wand des gesunden Blutgefäßes ist aus einer einzelnen Schicht von Endothelzellen aufgebaut (vgl. Abb. 1A). Das intakte Gefäßendothel besitzt ausgesprochen antithrombotische Eigenschaften und verhindert einen Kontakt des strömenden Blutes mit den tiefer gelegenen Schichten der Gefäßwand (203). Unmittelbar unterhalb der Endothelschicht liegt eine Basalmembran mit einem dichten Geflecht aus Bindegewebsfasern, welche als subendotheliale Matrix bezeichnet wird. Diese ist u.a. aus Kollagen, Elastin, Fibronectin, Vitronectin und Laminin aufgebaut und besitzt stark thrombogene Eigenschaften (156). Nach einer Verletzung der Gefäßwand kommt es zum Austritt von Blut aus dem Gefäßbett in das umliegende Gewebe. Beim gesunden Menschen führt der Kontakt des Blutes mit der subendothelialen Matrix in kurzer Zeit zu einem Verklumpen des Blutes und damit zum Sistieren der Blutung. Alle Reaktionen, die zu dieser Blutgerinnung beitragen, lassen sich unter dem Begriff der „Hämostase“ zusammenfassen (239). Dabei beruht die Blutstillung auf einer komplexen Wechselwirkung zwischen der Gefäßwand, den Thrombozyten, den Bestandteilen der plasmatischen Gerinnung und der Fibrinolyse, sowie den lokalen Strömungseigenschaften des Blutes. In didaktischer Gliederung wird der Ablauf der Hämostase in 3 Phasen (16, 104, 169, 347) unterteilt:

- Primäre Hämostase
- Sekundäre Hämostase
- Fibrinolyse

Unmittelbar nach einer Gefäßverletzung kommt es im Rahmen der **primären Hämostase** zu einer reflektorischen Gefäßkontraktion mit dem Ziel einer Reduktion des Blutflusses (16, 200, 347). Die vorbeiströmenden Thrombozyten bleiben an der subendothelialen Matrix haften (104, 358). Dieser Adhäsion folgt eine Aktivierungsreaktion und weitere Thrombozyten lagern sich durch Aggregation an den sich bildenden primären Thrombozytenpfropf an (34, 266, 288). Dieser *weiße Abscheidungsthrombus* (347) stillt vorübergehend die Blutung. Er ist jedoch noch zu instabil, um bei nachlassender Vasokonstriktion dem Blutstrom standzuhalten, und könnte von der Stelle der Gefäßwandläsion abgespült werden (Abb. 1B).

A – Blutfluß bei intakter Gefäßwand:B – Primäre Hämostase:C – Sekundäre Hämostase:Legende:**Abbildung 1:** Überblick über den Ablauf der Hämostase nach einer Gefäßwandverletzung

Parallel zur Bildung des primären Thrombozytenpfropfes löst die Verletzung der Gefäßwand eine kaskadenartige Reaktion von im Plasma gelösten Gerinnungsfaktoren aus, die als plasmatische Gerinnung oder **sekundäre Hämostase** bezeichnet wird (347). Im Kern dieses Mechanismus steht die Bildung von Thrombin, welches im Plasma gelöstes Fibrinogen zu monomerem Fibrin spaltet (16, 169, 200). Dieses polymerisiert zu einem dichten Netzwerk aus Fibrinfäden, das durch die Wirkung von Faktor XIII schließlich über Quervernetzungen gefestigt wird und den anfänglich losen Plättchenpfropf stabilisiert. Aufgrund des eingeschlossenen Anteils an Erythrozyten wird dieses sekundäre Gerinnsel auch als *roter*

Thrombus (347) bezeichnet. Durch anschließende Retraktion der Fibrinfäden werden die Wundränder einander angenähert und die Blutung dauerhaft gestoppt. Erfasst dieser Vorgang das gesamte Gefäßlumen, so kommt es zu einem thrombotischen Verschluss (Abb. 1C).

Das Wirkungsprinzip der plasmatischen Gerinnung beruht darauf, dass nach einer Gefäßverletzung zunächst eine kleine Menge eines Gerinnungsfaktors aktiviert und diese Aktivierung dann über eine sequentielle Kaskade weiterer Aktivierungsreaktionen so verstärkt wird, dass schließlich eine adäquate Menge an Thrombin gebildet werden kann (205, 206). Nach gegenwärtiger Auffassung basiert der einleitende Schritt auf der Freisetzung von Gewebsthromboplastin (Tissue factor, TF), einem membrangebundenen Protein, welches von einer Vielzahl von Körperzellen aber nicht von der inneren Endothelzellschicht exprimiert wird (12, 241). Durch Assoziation mit TF wird Faktor VII in seine aktive Form zu Faktor VIIa überführt und aktiviert nun seinerseits Faktor X zu Faktor Xa (192). Faktor Xa bildet in Assoziation mit Kofaktor V und Calciumionen einen membranständigen Enzymkomplex, der nun unter Abspaltung der Prothrombinfragmente 1 und 2 (PF1+2) Prothrombin (Faktor II) zu aktivem Thrombin (Faktor IIa) spaltet. (99) Dieser Weg der plasmatischen Gerinnung ist innerhalb von Sekunden aktiviert (347) und wird aufgrund der Beteiligung von exogenem TF als *extrinsisches System* bezeichnet.

Daneben existiert ein zweiter langsamerer Weg, welcher auf den Kontakt mit fremden Oberflächen reagiert und als *intrinsisches System* bezeichnet wird. In diesem System kommt es unter der Beteiligung von Präkallikrein und hoch-molekularem Kininogen (HMK) zur sequentiellen Aktivierung der Faktoren XII, XI und IX. Aktivierter Faktor IXa formt schließlich mit Kofaktor VIIIa und Calciumionen einen weiteren membranständigen enzymatisch aktiven Komplex, der nun ebenfalls Faktor X zu aktivieren vermag und so mit dem extrinsischen System auf einer gemeinsamen Endstrecke mündet (239). Zwischen beiden Gerinnungssystemen bestehen Querverbindungen und dem intrinsischen System kommt die Bedeutung einer wichtigen Verstärkerschleife der extrinsischen Aktivierung zu. So ist die Aktivierung von Faktor X über die intrinsische Enzymkaskade etwa 50-fach effektiver als durch die Wirkung von FaktorVIIa/TF alleine und die Effektivität der Bildung von Thrombin wird durch die Beteiligung der Kofaktoren Va und VIIIa etwa um das 10^5 bis 10^6 -fache gegenüber der alleinigen Enzymaktivität des Faktors Xa beschleunigt (206).

Neben der Bildung des primären Plättchenthrombus und seiner Stabilisierung durch die plasmatische Gerinnung wird die **Fibrinolyse** als dritte Phase ebenfalls der Hämostase zugerechnet. Sie dient dem Abbau von überschüssigem Fibrin und sorgt nach suffizienter Wundheilung für eine Wiedereröffnung und Reperfusion des Gefäßbettes (239, 347). Im

Mittelpunkt der Fibrinolyse steht das Proenzym Plasminogen, das durch Aktivierung in die aktive Serinprotease Plasmin überführt wird (40). Als unspezifisches aber leistungsstarkes Enzym, welches u.a. einige Matrix-Metalloproteinasen aktiviert oder Fibrinogen und auch monomeres Fibrin zu spalten vermag, dient Plasmin in erster Linie der Auflösung des über Querbrücken stabilisierten Fibrinnetzes, indem es dieses enzymatisch spaltet und dabei die sogenannten Fibrinspaltprodukte freisetzt (48). Unter physiologischen Bedingungen kann Plasminogen entweder durch t-PA (tissue-type plasminogen activator) in Anwesenheit von Fibrinpolymeren (48) oder durch u-PA (urokinase-type plasminogen activator) unter Beteiligung von Faktor XIIa, Präkallikrein und HMK aktiviert werden (179). Freies Plasmin wird zügig durch α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin inaktiviert (48).

Mit dem Ziel, die Thrombusbildung auf den Ort der Verletzung zu begrenzen und ein Überschießen der Gerinnung zu verhindern, existieren einige Inhibitoren, welche aktivierte Gerinnungsfaktoren zügig inaktivieren, bevor eine nennenswerte Thrombin- oder Fibrinbildung einsetzen kann (169, 206, 239, 347). Neben den antithrombotischen Mechanismen der Endothelzellen (156, 203) sind vor allem die Inaktivierung von Thrombin durch Antithrombin III (AT III) zu einem inaktiven Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) (284), die Hemmung von Thrombin und den Kofaktoren Va und VIIIa durch die Wirkung von Thrombomodulin sowie Protein C und S (75, 76, 162) und schließlich die effektive Blockade des extrinsischen Systems durch den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) zu nennen (37, 271).

Bereits 1949 hatten SEEGERs et al. auf die Bedeutung von Phospholipiden für den Gerinnungsablauf hingewiesen (206). Im Zentrum der plasmatischen Gerinnung steht der Aufbau von membrangebundenen Enzymkomplexen, die alle nach einem gemeinsamen Muster aufgebaut sind. Eine aktivierte Serinprotease (Faktor VIIa, IXa oder Xa) bindet an einen nichtenzymatischen Kofaktor (TF, Faktor VIIIa oder Va) und formt unter Anwesenheit von Ca^{++} -Ionen einen Enzymkomplex auf der Oberfläche von Zellen, deren Membranen überwiegend aus negativ geladenen Phospholipiden aufgebaut sind (163, 204). Dies steigert die jeweilige Enzymaktivität des Komplexes um mehrere Größenordnungen (131, 206) und schützt vor frühzeitiger Inaktivierung durch die oben genannten Inhibitoren.

Ausgehend von den letztgenannten Überlegungen und der Erfahrung, dass das klassische Kaskadenmodell für eine schlüssige Erklärung des Gerinnungsablaufs *in vivo* und seiner gezielten Kontrolle nicht mehr ausreicht, wird zunehmend in Frage gestellt, ob die Regulation des Gerinnungsablaufes allein auf einem interaktiven Wechselspiel zwischen einer im Plasma gelösten Kaskade von Gerinnungsfaktoren, ihren jeweiligen Inhibitoren und der Fibrinolyse beruht. In ihrem „zellgestützten Modell der Hämostase“ formulierten HOFFMANN &

MONROE die Hypothese, dass der Ablauf der Blutgerinnung in erster Linie durch die Funktion von Zellen kontrolliert wird (142). Diesem Modell folgend wird die Blutgerinnung durch den Kontakt von Blut mit Tissue Factor tragenden Zellen initiiert, auf deren Oberfläche über TF, Factor VIIa und Xa zunächst eine kleine Menge Thrombin gebildet wird. Zusammen mit der Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix führt diese kleine Menge Thrombin in einem zweiten Schritt zur Aktivierung der Thrombozyten und der weitere Ablauf der Gerinnung wechselt auf die Thrombozyten über. Auf deren Oberfläche sind die Enzymkomplexe vor Inaktivierung geschützt und können ihre enzymatische Aktivität um mehrere Größenordnungen beschleunigt fortsetzen. Die stark antithrombotischen Eigenschaften der Endothelzellen, als dritter beteiligter Zellart, verhindern schließlich ein Überschießen der Hämostase und begrenzen sie auf den Ort der Gefäßläsion. Nach Ansicht der Autoren liegt der entscheidende Schritt für eine suffiziente Thrombin- und damit auch Fibrinbildung im Übergang des Gerinnungsablaufs von der Tissue Factor tragenden Zelle auf die Oberfläche aktivierter Thrombozyten. Gelingt dieser Schritt nicht, so wird die weitere Thrombinbildung zügig durch TFPI unterbunden und das bereits gebildete Thrombin durch ATIII inaktiviert (142). Dieses Modell unterstreicht die hohe Bedeutung, die den Thrombozyten neben der primären Hämostase auch in der Kontrolle der sekundären Hämostase zukommt.

1.1.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes. Neben ihren Aufgaben im Rahmen der Blutstillung übernehmen Thrombozyten wichtige Funktionen der Wundheilung und der Gefäßreparatur. Darüber hinaus sind sie im Zusammenspiel mit Leukozyten und Endothelzellen auch an Entzündungsprozessen beteiligt (131, 132). Eine Beteiligung an der Entstehung von Arteriosklerose wird ebenfalls diskutiert (306).

Der Normbereich für die Thrombozytenzahl im Blut eines Erwachsenen liegt zwischen 150 und 350 Gpt/l (347). Thrombozyten haben eine mittlere Lebenszeit von 6-10 Tagen (53, 129, 294) und entstehen als zytoplasmatische Abschnürungen der Megakaryozyten im Knochenmark (36, 154, 246). Die tägliche Neubildungsrate beträgt 15 bis 20 % der Gesamtplättchenzahl. Neben weiteren Zytokinen unterliegt die Bildung von Blutplättchen vor allem der Wirkung von Thrombopoetin (47, 81, 349). Wenngleich junge Thrombozyten noch Reste an mRNA aufweisen (10, 52, 53, 123), besitzen sie als Zellfragmente keinen Zellkern und damit auch nicht die Fähigkeit zu einer anhaltenden, eigenständigen Proteinsynthese.

In Ruhe zirkulieren Thrombozyten als flach ovale Scheiben mit einem Durchmesser von 2-5 μm (161). Ihr Volumen wird mit 4-7,6 fl (91) und ihr mittleres Gewicht mit ca. 10 pg angege-

ben (237). Ein kräftiges Maschenwerk aus Mikrofilamenten durchzieht das Zellinnere und stabilisiert die scheibenförmige Gestalt gegenüber Scherkräften oder Verformungen durch andere Zellen (125). Dieses dreidimensionale Zytoskelett besteht überwiegend aus Aktinfilamenten und geht unterhalb der Zelloberfläche in das zweidimensionale Membranskelett über (238). Die hohe Konzentration an Aktinmolekülen, welche allein ca. 10 % des gesamten Zytoplasmarumes ausfüllen, verweist auf die wichtige Bedeutung dieses Zellskelettes (124). Zusätzlich befindet sich dicht unter der äußeren Zellmembran ein ringförmiges Bündel von ca. 20 Mikrotubuli, welche die flach ovale Form des ruhenden Plättchens aufspannen und für zusätzliche Stabilität sorgen (237).

Neben dem Zytoskelett bildet ein umfangreiches Membransystem das zweite wesentliche Strukturelement des Plättchenaufbaus. Analog zu anderen Zellen besteht auch die Plättchenmembran aus einer Doppelschicht von Phospholipiden. Für ihre Funktion ist entscheidend, dass Innen- und Außenseite der Membran aus unterschiedlichen Phospholipiden aufgebaut sind. Während im ruhenden Plättchen die Innenseite reich an Phosphatidylserin ist, sorgt ein hoher Gehalt an Phosphatidylcholin oder -ethanolamin in der äußeren Membranseite für eine antikoagulative Oberfläche, die der Entstehung der membrangebundenen Enzymkomplexe der plasmatischen Gerinnung entgegenwirkt (131). Zahlreiche Proteine sind in die Membran eingelagert und vermitteln als Rezeptoren den Kontakt zu anderen Oberflächen oder Zellen, leiten Signale durch die Membran oder ermöglichen einen Stoffaustausch mit der Umgebung. Ungewöhnlich ist die hohe Dichte an Membranproteinen, welche die Plättchenmembran zu einem wahren Rezeptorenkonzentrat machen (125). Neben Rezeptoren für Bestandteile der subendothelialen Matrix wie etwa Kollagen und Rezeptoren für wichtige Stimulatoren wie Thrombin, Adenosindiphosphat (ADP) oder Adrenalin sind vor allem der Fibrinogenrezeptorkomplex (GP IIb-IIIa) und der von Willebrand-Faktor Rezeptorkomplex (GP Ib-V-IX) zu nennen (58). Beide Komplexe liegen mit bis zu 50 000 Kopien pro Blutplättchen vor (125). Die Mehrzahl der Rezeptoren ist über Verbindungsproteine im Membranskelett verankert (87). Neben der äußeren Zellmembran gibt es zahlreiche Membraneinstülpungen, die sich als kleine Kanälchen nach Innen fortsetzen und als oberflächenverbundenes Kanälchensystem (surface-connected canalicular system, SCS) bezeichnet werden (237). Ein weiteres Kanalsystem mit elektronendichtem Inhalt, das dense tubular system (DTS), durchzieht das Plättcheninnere und dient als intrazellulärer Speicher für Calciumionen (91, 238).

Als dritte strukturelle Zone im Thrombozytenaufbau findet sich die im Zellinneren gelegene Zone der Zellorganellen. Hier überwiegen verschiedene Formen von Speichergranula, die nach ihren Inhaltsstoffen als α -Granula, dichte Granula oder Lysosomen bezeichnet werden.

Die zahlenmäßig häufigeren α -Granula sind charakteristisch für Thrombozyten und speichern in hoher Konzentration eine Vielzahl von Stoffen, die während der Aktivierung nach außen freigesetzt werden und für die Thrombozytenfunktion wesentlich sind. Neben Adhäsionsproteinen und Gerinnungsfaktoren finden sich auch Komponenten der Fibrinolyse, Chemotaxine und entzündungsfördernde Stoffe sowie Wachstumsfaktoren, welche die spätere Gefäßreparatur oder Neubildung initiieren (104, 237). Die Membran der α -Granula ist mit der äußeren Plättchenmembran nahezu identisch (22) – mit Ausnahme von P-Selektin (CD62P), welches auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten nicht exprimiert wird (93, 119). Die dichten Granula (dense bodies) sind nach ihrem elektronenmikroskopisch dichten Inhalt benannt (214). Dieser besteht überwiegend aus Calciumionen (Ca^{++}) und niedermolekularen Verbindungen wie Adeninnukleotiden (ATP/ADP) oder Serotonin, die ebenfalls auf Bedarf freigesetzt werden können und für den Ablauf der Blutstillung essentiell sind. Die lysosomalen Granula ähneln den Lysosomen anderer Zellen. Ihre Freisetzung unterstützt die spätere Auflösung des Blutgerinnsels. Daneben umfasst die Zone der Organellen zahlreiche Glykogenspeicher und Mitochondrien. Ihr Anteil entspricht dem glatter Muskelzellen und weist auf den hohen Energiebedarf und die große Stoffwechselaktivität der Thrombozyten hin (237).

1.1.2 Funktion der Thrombozyten

Beim Übergang aus der Ruhe in den aktivierten Zustand durchlaufen die Thrombozyten eine Reihe von morphologischen und funktionellen Veränderungen (347). Auslöser der Thrombozytenaktivierung ist unter physiologischen Bedingungen der Kontakt der Thrombozyten mit der subendothelialen Matrix nach Verletzung der Endothelzellschicht (16). Daneben gibt es eine Reihe von Stimulantien, welche den Aktivierungsvorgang über plättcheneigene Rezeptoren zusätzlich unterstützen. Dabei wird zwischen starken Agonisten, die eine vollständige Aktivierung ohne weitere Unterstützung bewirken können, und schwachen Agonisten, die ein zusätzliches Stimulans benötigen, unterschieden (187). Zu den starken Agonisten zählen Thrombin, Thromboxan, PAF (platelet activating factor) und Kollagen. Als schwache Agonisten gelten u.a. Adrenalin, Serotonin oder Adenosindiphosphat (ADP). Ferner kommt den unter Strömungsbedingungen im Gefäßbett vorherrschenden Scherkräften eine wichtige aktivitätssteigernde Bedeutung zu (232, 289).

Die vollständige Aktivierung von Thrombozyten umfasst insgesamt fünf Teilschritte. Diese sind nicht an eine feste Aktivierungsfolge gebunden, sondern laufen je nach auslösendem Stimulus teils synchron, teils zeitversetzt zueinander ab. In didaktischer Gliederung lassen sich folgende Schritte unterscheiden (vgl. Abb. 2):

- Formwandel (shape change)
- Ausbildung einer prokoagulativen Oberfläche
- Adhäsion
- Aggregation
- Sekretion

Nach Aktivierung durchlaufen Thrombozyten einen raschen **Formwandel**. Dabei verlieren sie ihre scheibenförmige Gestalt und nehmen eine rundliche Form mit auswärtsgerichteten, langgestreckten Zellausläufern (Pseudopodien) an (104). Der Formwandel wird durch eine Reorganisation des Zytoskeletts mit aktiver Ausbildung von fibrillären Aktin- und Myosin-komplexen sowie zentrifugaler Ausrichtung der Mikrotubuli in den Pseudopodien erreicht (87, 125). Dabei kommt es zu einer Ausstülpung des oberflächenverbundenen Membransystems (SCS), das als zusätzliches Membranreservoir dient. Dies führt zu einer deutlichen Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten von durchschnittlich $8\ \mu\text{m}^2$ in Ruhe auf ca. $13\ \mu\text{m}^2$ nach erfolgtem Formwandel (237).

Die **Ausbildung einer prokoagulativen Oberfläche** stellt einen eigenständigen Teilschritt der Thrombozytenaktivierung dar (131). Durch Verlust der in Ruhe bestehenden Asymmetrie zwischen Innen- und Außenseite der Plättchenmembran kommt es zu einer Verlagerung von negativ geladenen Phospholipiden, insbesondere Phosphatidylserin, auf die Außenseite (25). Dadurch entsteht eine negativ geladene Oberfläche, die unter Anwesenheit von Calciumionen eine erhöhte Bindungsfähigkeit für die aktivierten Cofaktoren Va und VIIIa aufweist und damit die Bildung der membrangebundenen Enzymkomplexe der plasmatischen Gerinnung katalysiert. Neben der Ausbildung der negativ geladenen Oberfläche wird ferner die Existenz von spezifischen Membranrezeptoren für aktivierte Gerinnungsfaktoren postuliert (142). Die Ausbildung einer prokoagulativen Oberfläche und die Membranvergrößerung durch den Formwandel schaffen eine wesentliche Voraussetzung für eine suffiziente Thrombinbildung. Unter Strömungsbedingungen (shear stress) kann eine weitere Oberflächenvergrößerung durch die Abschnürung von kleinen Membranpartikeln erreicht werden. Diese *Mikropartikel* besitzen ebenfalls eine prokoagulative Oberflächenaktivität (144, 232, 289).

Die feste Anlagerung der Thrombozyten an die subendotheliale Matrix wird als **Adhäsion** bezeichnet. Thrombozyten besitzen zahlreiche direkte Bindungsstellen für Komponenten der subendothelialen Matrix (58). Die Affinität der Mehrzahl dieser Rezeptoren ist jedoch nicht groß genug, um den hohen Scherkräften des Blutstromes zu widerstehen und einen festen Kontakt von noch nicht aktivierten Thrombozyten zur Stelle der Endothelläsion herzustellen (358). Die *primäre Adhäsion* wird daher über eine Interaktion von an Kollagen gebundenen

von-Willebrand-Faktor (vWF) mit dem von-Willebrand-Faktor Rezeptorkomplex (GP Ib-V-IX, CD42) auf der Thrombozytenoberfläche erreicht (5, 23). Der überwiegend von Endothelzellen synthetisierte vWF ist ein multimeres Glykoprotein mit einer Größe zwischen 500 und 20000 kDa, das überwiegend als Komplex mit Faktor VIII im Blutplasma zirkuliert. Während im Plasma zirkulierender vWF nicht an Thrombozyten binden kann, erfolgt durch den Kontakt zum Subendothel eine Konformationsänderung im vWF-Molekül, die zur Expression einer hochaffinen Bindungsstelle für GP Ib-V-IX auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten führt (58). Als Brücke zwischen Gefäßwand und Thrombozyten besitzt vWF eine ausreichende Bindungskraft, um den Strömungskräften des Blutflusses zu widerstehen, und bewirkt so eine Anlagerung bzw. ein langsames Abrollen der Thrombozyten an der Gefäßwand (23). Im weiteren Verlauf sorgt nun der direkte Kontakt der Membranrezeptoren für Fibrinogen, Kollagen, Laminin oder Fibronectin mit der subendothelialen Matrix für eine Stabilisierung der Adhäsion (358) und führt zu einer flächigen Ausspreizung der Thrombozyten (104). Die primäre Adhäsion der ruhenden Thrombozyten über vWF und die nachfolgende Bindung des Kollagenrezeptors bewirken eine Aktivierung der Thrombozyten (34, 187). Dabei kommt es durch Reorganisation des Zytoskelettes zu einer Internalisierung von GP Ib-V-IX einschließlich des gebundenen Kollagens ins Zellinnere (238). Dies bewirkt eine Retraktion des sich bildenden Blutgerinnsels, wie auch eine Abnahme der Zahl an GP Ib-V-IX Komplexen auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten (105, 218). Die Anlagerung bereits aktivierter Thrombozyten wird als *sekundäre Adhäsion* bezeichnet (104).

Aggregation beschreibt die Bindung von Thrombozyten an andere Thrombozyten. Die Bildung von Thrombozytenaggregaten erfolgt über eine Querbrückenbindung zwischen den ausschließlich auf Zellen der thrombozytären Reihe vorkommenden Glycoprotein IIb-IIIa Rezeptorkomplexen und dem Gerinnungseiweiß Fibrinogen, welches durch seinen symmetrischen Aufbau als Brückenmolekül dient (121, 288). Ruhende Thrombozyten besitzen keine Bindungsstelle für Fibrinogen. Erst nach Aktivierung kommt es durch eine Konformationsänderung im GP IIb-IIIa Komplex zur Öffnung einer Bindungstasche für Fibrinogen (259). Diese Bindung ist abhängig von Calciumionen und erfolgt über die im Fibrinogenmolekül jeweils vierfach vorhandene RGD-Sequenz, einer Aminosäurefolge aus Arginin-Glycin-Aspartat (288). Daneben existiert eine weitere Bindungsdomäne aus 12 Aminosäuren, die ebenfalls vom Fibrinogenrezeptor erkannt wird. Man unterscheidet zwischen einer *primären Aggregation* mit einer zunächst nur lockeren und im Verlauf reversiblen Bindung und einer *sekundären Aggregation* (104). Letztere setzt erst verzögert nach vollständiger Aktivierung der Thrombozyten ein und ist irreversibel. So entsteht über Bildung von Mikroaggregaten –

kleinen Aggregaten zwischen mindestens 2 und maximal 20 Thrombozyten, wie sie unter experimentellen Bedingungen beobachtet werden können (92) – schließlich der primäre Thrombus. Da die RGD-Sequenz den meisten Adhäsionsproteinen gemeinsam ist, vermag der aktivierte GP IIb-IIIa Rezeptor neben Fibrinogen auch andere Matrixkomponenten wie Fibronectin oder kollagen-immobilisierten vWF zu binden und beteiligt sich damit auch an der Adhäsion (58, 259). Die Aktivierung führt ferner zu einer Mobilisierung weiterer GP IIb-IIIa Rezeptoren aus einem intrazellulären Pool auf die Thrombozytenoberfläche (237).

Die **Sekretion** komplettiert die vollständige Aktivierung der Thrombozyten und bildet einen zentralen Teilschritt im Ablauf der primären und sekundären Hämostase. Unter Wirkung der aktivierten Phospholipase A₂ wird Arachidonsäure aus der Plättchenmembran freigesetzt und dient der plättcheneigenen Cyclooxygenase als Substrat zur Synthese von Thromboxan A₂ (34). Nach Abgabe in den Extrazellularraum aktiviert TxA₂ über einen spezifischen Rezeptor vorbeiströmende Thrombozyten und rekrutiert diese aus der Zirkulation zur Adhäsion und Aggregation. Gleichzeitig verstärkt TxA₂ im Sinne einer autokrinen Stimulation die weitere Aktivierung der Thrombozyten und unterstützt über seine vasokonstriktive Wirkung die Blutstillung durch eine Verlangsamung des Blutstromes (347). Neben der *de-novo* Synthese von TxA₂ kommt es durch Degranulation der dichten Granula zur Freisetzung von ADP und Serotonin, die ebenfalls vasokonstriktive und thrombozytenaktivierende Wirkung besitzen

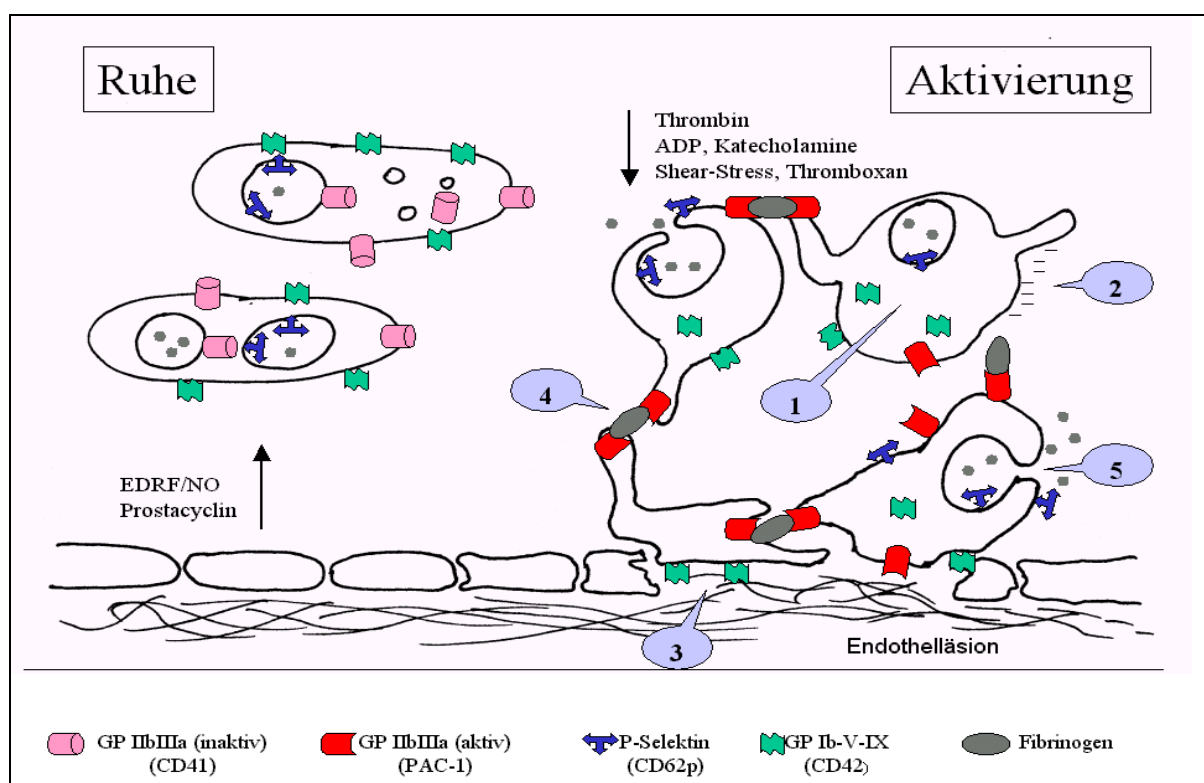


Abbildung 2: Aktivierung von Thrombozyten mit Formwandel (1), Ausbildung einer prokoagulativen Oberfläche (2), Adhäsion (3), Aggregation (4) und Sekretion (5)

(214). Die Sekretion aus den zahlreichen α -Granula erhöht u.a. die lokale Konzentration von wichtigen Adhäsions- und Gerinnungsproteinen. Unter den zahlreichen freigesetzten Einzelstoffen finden sich Plättchenfaktor 4 (PF4, heparin neutralizing protein) und β -Thromboglobulin (β -TG). Der Nachweis beider Substanzen im Blut gilt als indirekter Nachweis einer Thrombozytenaktivierung in vivo (55). Im Zuge der Sekretion kommt es durch Membranfusion zum Übertritt von P-Selektin (CD62P) aus der Membran der α -Granula auf die Thrombozytenoberfläche (310). Dies kann in der Laboruntersuchung als direkter Marker einer Thrombozytenaktivierung herangezogen werden (226, 302). Als Mitglied der Selektinfamilie, welche als Adhäsionsmoleküle der Interaktion zwischen Zellen dienen (259), vermittelt P-Selektin die Adhäsion von Blutplättchen an weiße Blutkörperchen (93, 119).

1.2 Thrombozyten und körperliche Belastung

Ein Anstieg der Thrombozytenzahl unter körperlicher Belastung ist langjährig bekannt (56, 260). In Abhängigkeit von Belastungsintensität und Belastungsdauer wird eine Zunahme zwischen 18 und 80 % berichtet (33). Diese belastungsinduzierte Thrombozytose tritt unabhängig von Veränderungen in der Hämokonzentration auf und ist ferner durch einen raschen Rückgang der Thrombozytenzahl nach Belastungsende charakterisiert.

Als Hintergrund der belastungsinduzierten Thrombozytose gilt eine zügige Freisetzung von vorbestehenden Thrombozyten aus der Milz (42, 292). Versuche mit radioaktiv markierten Thrombozyten zeigen, dass sich nach Retransfusion etwa 30 bis 40 % der Thrombozyten in der Milz ansammeln (134, 185). Dieser Thrombozytenpool steht in ständigem Austausch mit den zirkulierenden Blutplättchen (263) und kann durch die α -adrenerge Wirkung von Katecholaminen binnen Minuten in die Zirkulation freigesetzt werden (7, 88, 332). Zahlreiche Studien legen nahe, dass die Milz bevorzugt junge Thrombozyten speichert (90, 304) und dass diese gegenüber alten Thrombozyten ein größeres Zellvolumen und eine höhere Aktivität besitzen sollen (3, 49, 50, 126, 166, 167). Diesem Konzept folgend geht die belastungsinduzierte Thrombozytose mit einem Anstieg der Größenverteilung von Thrombozyten und damit auch der Zahl jüngerer und funktionell aktiverer Zellen einher (89, 90). Zwar berichten auch CHAMBERLAIN et al. 1990 von einer Zunahme des mittleren Plättchenvolumens unter körperlicher Belastung, doch ergaben sich keine Unterschiede in der Altersverteilung zwischen zirkulierenden und in der Milz gepoolten Thrombozyten. Eine eigenständige Subpopulation von Thrombozyten konnte nicht nachgewiesen werden (42). Ebenso fanden SCHMIDT & RASMUSSEN keine vermehrte Ausschüttung junger Thrombozyten nach Belastung (293). An anderer Stelle konnte gezeigt werden, dass ein größeres Plättchenvolumen

häufig mit einer höheren Aggregationsfähigkeit und einer stärkeren Sekretionsleistung einhergeht (207, 318), doch beeinflussen Größe und Alter die Plättchenfunktion jeweils unabhängig voneinander (320). Zusätzlich wurde eine mit dem Alter abnehmende Größe wiederholt kritisch in Frage gestellt, da Thrombozyten unterschiedlicher Größe in jedem Alter gefunden werden können (27, 28, 258, 262, 319).

Neben der Freisetzung aus der Milz ist die Existenz weiterer Thrombozytenpools sehr wahrscheinlich, da auch nach Entfernung der Milz ein Anstieg der Thrombozytenzahl unter körperlicher Belastung (56, 89) oder nach Adrenalininfusion (331) beobachtet werden konnte. Im Tiermodell wurde der Anteil dieses *non-splenic platelet pools* auf ca. 45 % der mobilisierbaren Thrombozyten geschätzt (89). VILEN et al. errechneten einen Anteil von ca. 20 % beim Menschen (331). Andere Studien konnten einen Anstieg der Thrombozyten bei splenektomierten Personen nach körperlicher Belastung (267) oder Adrenalininfusion (7) nicht reproduzieren. Szintigraphische Studien verweisen neben der Milz auch auf eine Anreicherung von Thrombozyten in der Leber (134, 178, 292). Daneben berichten BIERMAN et al. von einer raschen Freisetzung von Thrombozyten aus der Lungenstrombahn nach Katecholamingabe (26). Ähnlich dem Verhalten von Granulozyten ist auch ein Übergang von Thrombozyten aus einem marginalen, der Gefäßwand anhaftenden Pool in den axialen Blutstrom bei forcierter Kreislauftsituation möglich (89, 292). Nach Ausführungen von FREEDMAN et al. sequestriert die Milz bevorzugt sogenannte Megathrombozyten – junge und überdurchschnittlich große Thrombozyten, die nach ihrer Abgabe in die Zirkulation in einzelne Blutplättchen zerfallen (90). Ebenso wurde von einer Freisetzung junger Thrombozyten aus reifen Megakaryozyten berichtet, die in den Knochenmarksinusoiden und der Lungenstrombahn zurückgehalten werden sollen (74, 193). Auch für die Freisetzung junger Thrombozyten über die Vorstufe sogenannter *proplatelets* wird eine Beteiligung der Lungenstrombahn diskutiert (155).

Noch widersprüchlicher als die Angaben zum Ursprung der belastungsinduzierten Thrombozytose sind die bislang publizierten Untersuchungsergebnisse zur Thrombozytenfunktion unter Belastung (33, 71, 72). Neben der Schwierigkeit, dass der Umgang mit Thrombozyten häufig zu einer raschen Aktivierung *ex vivo* führt und vielfach unterschiedliche Belastungsformen verglichen wurden, beruht das eigentliche Problem auf dem Fehlen einer etablierten Referenzmethode zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion. Mit unterschiedlichen Ansätzen und Methoden wurden jeweils verschiedene Teilschritte der Thrombozytenfunktion untersucht und als Hinweise auf eine Aktivierung interpretiert. Beim Vergleich der bislang vorliegenden Studien muss daher beachtet werden, inwieweit jeweils Veränderungen von Sekretion, Adhäsion oder Aggregation als Zeichen einer Aktivierung herangezogen wurden.

Zahlreiche Studien belegen einen Serumanstieg der thrombozytenspezifischen Sekretionsprodukte β -Thromboglobulin (β -TG) und Plättchenfaktor 4 (PF4) nach Belastung und werten diesen Anstieg als indirekten Nachweis einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* (69, 108, 133, 180, 215, 265, 280, 291, 313, 337, 348). Diese Ergebnisse blieben nicht unwidersprochen, da andere Arbeiten keine vergleichbare Zunahme nachweisen konnten (42, 68, 148, 208, 210, 290). HURLÉN et al. berichteten sogar über einen Rückgang von β -TG nach einem Stufentest auf dem Radergometer bei Patienten 3 Monate nach überstandenen Herzinfarkt (149). MANT et al. beobachteten bei wiederholter Blutabnahme aus einem Verweilkatheter zunächst einen Anstieg von β -TG und PF4 nach körperlicher Belastung, konnten diesen Anstieg in späteren Versuchen mit jeweils frischer Venenpunktion jedoch nicht mehr reproduzieren (208). Ebenso wurde auch an anderer Stelle berichtet, dass der Anstieg von PF4 in erster Linie eine enge Beziehung zur Liegedauer des Verweilkatheters besitzt (286). Neben der jeweiligen Entnahmetechnik gilt auch die weitere Probenverarbeitung in hohem Maße als anfällig für eine artifizielle Freisetzung von PF4 und β -TG *in vitro* (202, 210, 313) und liefert eine mögliche Erklärung für die unerwartet hohen Ausgangswerte vor Belastung, wie sie in einigen der oben genannten Arbeiten gefunden wurden. Kritisch hinterfragt werden muss ferner, warum in einigen Untersuchungen, die einen signifikanten Anstieg von β -TG nach Belastung zeigen (108, 215, 348), der Rückgang auf die Ausgangswerte nach Belastung schneller erfolgt, als anhand der Halbwertszeit zu erwarten wäre (55). In Ergänzung zu den Sekretionsprodukten der α -Granula berichteten andere Autoren nach Belastung von einer erhöhten Serumkonzentration für Thromboxan B₂, einem stabilen Abbauprodukt der thrombozytären Thromboxan A₂ Produktion (190, 255, 321). Dennoch konnten auch diese Arbeiten den Nachweis einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* nicht schlüssig führen. Wie PATRONO et al. anhand von spezifischen Abbauprodukte im Urin zeigen konnte, entstammen die erhöhten Werte am ehesten einer artifiziellen Aktivierung der Plättchen *ex vivo*, da die gemessenen Werte im Vergleich zu den Urinmessungen ein Vielfaches über den maximal zu erwartenden Serumkonzentrationen lagen (257).

Als weiteren Hinweis auf eine gesteigerte Thrombozytenaktivität fanden PRENTICE et al. sowie IKKALA et al. eine gesteigerte Thrombozytenadhäsion an Glas nach Belastung (153, 267). Hingegen blieb in anderen Studien die Thrombozytenadhäsion nach intensiver Belastung weitgehend unverändert (21, 345) oder ging nach ausgesprochen langen bzw. allenfalls moderaten Belastungen sogar zurück (21, 260). Solche Untersuchungen zur Adhäsion an unphysiologischen Fremdoberflächen wie Glas lassen jedoch wenig Rückschlüsse auf die tatsächliche Thrombozytenfunktion *in vivo* zu und sind heute allenfalls von historischem

Interesse (33). Jüngere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um WANG & CHEN zur Adhäsion von Thrombozyten erfolgten in einer mit Fibrinogen beschichteten Flusskammer, in welcher Scherkräfte zwischen 0 und 55 dyne/cm² simuliert werden können. Die Autoren belegten eine Zunahme der Adhäsion nach maximaler Stufentestbelastung auf einem Radergometer sowohl für aktive als auch für inaktive gesunde Normalpersonen. Hingegen ging nach einer moderaten Dauerbelastung die Adhäsionsneigung der Thrombozyten in der inaktiven Gruppe zurück. In der Gruppe der Trainierten zeigte sich kein entsprechender Rückgang nach moderater Belastung, jedoch wiesen diese schon in Ruhe eine geringere Adhäsionsneigung auf (337). In späteren Arbeiten konnten die Autoren dann zeigen, dass regelmäßiges Ausdauertraining die Adhäsionsneigung von Thrombozyten sowohl bei Männern als auch bei Frauen vermindert. Dieser Trainingseffekt war nach Ende der Trainingsphase binnen weniger Wochen vollständig reversibel (338, 339).

Wenngleich die letztgenannten Studien viele Schwierigkeiten älterer Arbeiten zur Thrombozytenadhäsion überwinden, sind jedoch unmittelbare Rückschlüsse auf die Thrombozytenaktivität nach körperlicher Belastung *in vivo* nicht uneingeschränkt möglich. So werden die Thrombozyten nach Präparation von plättchenreichem Plasma (PRP) zunächst für 12 Minuten in Ruhe auf der künstlichen Fibrinogenoberfläche inkubiert und erst anschließend den Flussbedingungen ausgesetzt. Damit erfolgt in diesem Modell die Adhäsion über die Interaktion zwischen dem oberflächengebundenen Fibrinogen und den GP IIb-IIIa Rezeptoren, während *in vivo* die primäre Thrombozytenadhäsion über die Interaktion des GP Ib-V-IX Komplexes mit kollagengebundenem vWF erreicht wird. Ferner ist auch die Präparation von PRP nicht unproblematisch, da durch die Entfernung der roten Blutkörperchen die Thrombozyten nicht mehr in ihrem physiologischen Milieu untersucht werden und durch Zentrifugation Thrombozyten sowohl aktiviert als auch desensibilisiert werden können (311). Ebenso ist davon auszugehen, dass bei der Herstellung von PRP der Anteil an großen und möglicherweise reaktiveren Thrombozyten oder Aggregaten gemeinsam mit der Fraktion der Erythrozyten ausgeschlossen wird und die dann zur Untersuchung gelangende Plättchenfraktion nicht die gesamte Population der Thrombozyten repräsentiert (207, 251).

Anfang der 70er Jahre bemerkten WU & HOAK, dass sich unter dem Einfluss von EDTA Thrombozytenaggregate wieder auflösen, während sie durch Fixierung mit 1%iger Formaldehyd/EDTA Lösung stabilisiert werden. Der Quotienten aus Plättchenzahl nach Fixierung und Plättchenzahl nach alleiniger Antikoagulation mit EDTA wird als Platelet-Aggregate-Ratio (PAR) bezeichnet. Eine PAR von 1 entspricht dem Fehlen von Aggregaten. Eine zunehmende Aggregation geht mit einem abfallenden PAR-Wert einher (354). Während

DRYGAS keine Veränderung der PAR nach körperlicher Belastung finden konnte (69), berichten andere Autoren von einem Rückgang der PAR nach Belastung für trainierte Gesunde (114) sowie untrainierten Koronarpatienten (149, 188) und schließen daraus auf eine verstärkte Thrombozytenaggregation *in vivo*. In einer Arbeit von KUMPURIS et al. zeigte sich zwar auch in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen ein Rückgang der PAR, doch konnte das gesetzte Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht erreicht werden (188). Ob ein Rückgang der PAR tatsächlich eine Thrombozytenaggregation *in vivo* widerspiegelt ist jedoch umstritten, da nicht mit Sicherheit geklärt ist, ob die gefundenen Aggregate bereits in der Zirkulation gebildet wurden oder erst nach der Blutabnahme unter der Wirkung der Fixierungslösung entstanden sind (39, 251).

Die weiteste Verbreitung zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion hat bislang die Methode der Aggregometrie nach BORN erfahren (32). Unter ständigem Rühren wird durch Zugabe eines Agonisten wie ADP, Kollagen, Adrenalin oder Thrombin zu plättchenreichem Plasma (PRP) eine Aggregation der Thrombozyten ausgelöst. Da die Lichtdurchlässigkeit einer Lösung in erster Linie von der Partikelzahl und nicht von der Partikelgröße abhängt, steigt mit zunehmender Aggregation auch die Transmission. Gemessen wird die Veränderung der Transmission im Vergleich zu plättchenarmen Plasma (PPP), welches einer Aggregation von 100 % gleichgesetzt wird, sowie die Geschwindigkeit der Transmissionsänderung. Alternativ können auch Veränderungen in Konzentrationen der Agonisten angegeben werden, die notwendig sind, um eine vordefinierte Transmissionsänderung auszulösen. Mehrere ältere Studien zeigten zwar eine signifikante Zunahme der Aggregationsneigung nach Belastung (65, 267, 345), sind in ihrer Aussagefähigkeit jedoch eingeschränkt, da versäumt wurde eine standardisierte Zellzahl einzustellen und belastungsinduzierte Veränderungen der Thrombozytenzahl unberücksichtigt blieben (33). Jüngere Arbeiten mit einer standardisierten Thrombozytenzahl fanden keine entsprechenden Unterschiede in der Aggregabilität nach Belastung bei gesunden Normalpersonen (153, 194, 215, 290, 305), wohl aber bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (194, 215, 290). Demgegenüber berichteten KNUDSEN et al. von einem Rückgang der Aggregabilität nach einem Ausdauerlauf bei trainierten und untrainierten Gesunden (180), während an anderer Stelle mehrfach eine Zunahme der Aggregationsneigung nach intensiver Belastung beschrieben wird (72, 247, 265, 324, 338, 339).

Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse liefert die Beobachtung, dass die Veränderungen in der Aggregabilität eine Abhängigkeit von der Belastungsintensität besitzen (43, 337). Darüber hinaus erschweren einige methodische Probleme die weitere Ergebnisinterpretation. So weist die Aggregometrie eine erhebliche Ergebnisvariabilität auf und eine

fehlende Standardisierung erschwert einen Vergleich der Ergebnisse untereinander (106). Weiterhin besitzt die Methode eine nur schwache Sensitivität für die Bildung von Mikroaggregaten, wie sie bevorzugt im Vollblut gefunden werden, während durch die höhere Zellkonzentration im PRP meist deutlich größere Aggregate bilden (51). Auf die Schwierigkeiten hinsichtlich einer artifiziellen Aktivierung und den möglichen Zellverlust, die sich aus der Präparation von PRP ergeben, wurde bereits hingewiesen. Ferner führt auch die Entfernung der Erythrozyten zu Veränderungen in der Funktionsweise der Thrombozyten (311). Die Aggregometrie liefert überdies keine Informationen über die tatsächliche Thrombozytenaktivität der *in vivo*. Vielmehr wird durch die zur Aggregationsmessung notwendige Stimulation letztendlich die Reaktivität der Thrombozyten untersucht. Darüberhinaus wird die Reaktionssumme aller im PRP gelösten Thrombozyten analysiert. Aussagen zum Funktionsverhalten einzelner Thrombozyten sind nicht möglich.

Seit der Einführung der Durchflusszytometrie in die Labordiagnostik bietet sich heute eine moderne und hoch effektive Methodik zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion (302). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Thrombozyten auf Einzelzellebene untersucht und innerhalb weniger Minuten einige Tausend Zellen analysiert werden. Der Einsatz von spezifischen aktivierungsabhängigen Antikörpern bietet dabei die Möglichkeit, einzelne Teilschritte der Aktivierungsreaktion von Thrombozyten unmittelbar auf der Zelloberfläche nachzuweisen und so den Funktionszustand der Thrombozyten direkt zu messen (2, 221, 297). So entspricht etwa das Anbinden von CD62P Antikörpern an P-Selektin Rezeptoren auf der Oberfläche von Thrombozyten dem Nachweis einer abgelaufenen Sekretionsreaktion. Ebenso erkennen PAC-1 Antikörper den GP IIb-IIIa Rezeptor nur nach aktivierungsabhängiger Konformationsänderung und belegen damit die bestehende Aggregationsneigung der Thrombozyten. Durch Zugabe von Agonisten bietet sich ferner die Möglichkeit, neben der direkten Aktivität der Thrombozyten auch ihre Reaktivität zu untersuchen.

In einer Studie von KESTIN et al. fand die Durchflusszytometrie erstmals 1993 auch in der Untersuchung der Thrombozytenfunktion während der belastungsinduzierten Thrombozytose Verwendung (170). Die Autoren beschrieben für untrainierte Normalpersonen eine signifikante Zunahme der Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten in Folge eines Stufentests auf dem Laufband. Für Trainierte konnten entsprechende Veränderungen hingegen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden MÖCKEL et al. auch bei Trainierten eine signifikante Zunahme der Plättchenaktivität nach einer ebenfalls stufenförmig ansteigenden Belastung (233). Diese widersprüchlichen Ergebnisse für Trainierte blieben in ihrer Ursache bislang ungeklärt. Für mäßig trainierte Normalpersonen beschrieben auch WALLEN et al. eine

gesteigerte Fibrinogenbindung nach Thrombinstimulation als Zeichen einer Reaktivitätszunahme nach einem Stufentest. Ein Rückgang der Oberflächenexpression für GP Ib-V-IX und eine gesteigerte Fibrinogenbindung unstimulierter Thrombozyten deuteten ferner auch eine Zunahme der Aktivität nach Belastung an. Das letztgenannte Ergebnis wurde jedoch dadurch relativiert, dass auch in einem Kontrollversuch ohne Belastungsintervention eine signifikante Zunahme der spontanen Fibrinogenbindung zu finden war (335).

Mit Einführung der Durchflusszytometrie aus dem Vollblut in die Funktionsuntersuchung von Thrombozyten durch SHATTIL et al. (302) konnten viele methodische Probleme überwunden werden (1, 221, 226, 297). Auch legte ein Konsensusprotokoll wesentliche Standards zur Durchführung durchflusszytometrischer Untersuchungen an Thrombozyten fest, doch wurde keine einheitliche Festlegung für eine detaillierte Versuchsdurchführung getroffen (297). Insbesondere hinsichtlich der Anforderungen an eine ausreichende Probenstabilität bestehen zahlreiche Widersprüche (227, 297). Während einige Autoren eine Fixierung der Thrombozyten erst nach der Inkubation mit Antikörpern bevorzugen (157, 170, 226, 279, 302), führen andere die Fixierung bereits vor der Inkubation durch (8, 105, 116, 211, 287, 297, 328). Dabei zeigen mehrere Arbeiten ein verändertes Bindungsverhalten von aktivierungsabhängigen Antikörpern nach Fixierung im Vergleich zu unfixierten Proben (157, 221, 226). Nach Fixierung mit Formaldehyd berichteten CAHILL et al. über eine gesteigerte Expression von CD62P und CD63 (39). Auch für die Fixierung mit Paraformaldehyd sind komplexe Veränderungen in der CD62P Expression und dem Bindeverhalten von Fibrinogen (147) sowie PAC-1 (135) beschrieben. Dennoch wird von der Mehrzahl der Autoren die Durchführung einer Fixierung empfohlen (8, 157, 226, 279, 287, 297, 302, 325). Diese erfolgt meist mit Paraformaldehyd in einer Endkonzentration von 0,5 bis 1,0 Prozent (226, 297). Demgegenüber ist bei unmittelbarer Antikörperfärbung binnen weniger Minuten nach Blutentnahme und Messung innerhalb von zwei Stunden auch eine Probenaufbereitung ohne vorausgehende Fixierung möglich (147, 302).

In den Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion nach körperlicher Belastung von KESTIN et al. sowie WALLEN et al. wurden die Thrombozyten zunächst mit den Antikörpern inkubiert und anschließend mit Formaldehyd fixiert (170, 335). Demgegenüber erfolgte die Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei MÖCKEL et al. an unmittelbar nach der Blutentnahme fixierten Thrombozyten (233). Offen bleibt dabei, inwieweit Veränderungen in der Thrombozytenfunktion nach Belastung durch Einflüsse der Fixierung überlagert oder verdeckt werden und ob die unterschiedlichen Probenaufbereitungen als Ursache für die widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse angesehen werden können.

Die Untersuchung der Thrombozytenaktivität mit Hilfe von spezifischen, aktivierungsabhängigen Antikörpern, insbesondere die Verwendung von CD62P (P-Selektin) galt bislang als „Goldstandard“ in der Funktionsuntersuchung von Thrombozyten (221). Daneben verdichteten sich in letzter Zeit die Hinweise darauf, dass sich aktivierte Thrombozyten durch Adhäsion an Leukozyten zu Zell-Zell Konjugaten verbinden können und dass der Nachweis dieser Thrombozyten-Leukozyten Konjugate als hoch sensibler Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* anzusehen ist (94, 228). Studienergebnisse zur Konjugatbildung unter körperlicher Belastung lagen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor.

2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit stellt sich die Frage nach Veränderungen in der Thrombozytenfunktion während der belastungsinduzierten Thrombozytose bei überwiegend gut trainierten Normalpersonen. In drei aufeinander aufbauenden Teilstudien mit jeweils unterschiedlichen Belastungsformen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach der Methode der direkten Immunfluoreszenzmarkierung jeweils die Aktivität der Thrombozyten und ihre Reaktivität vor und nach Belastung untersucht. Der eigentliche Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf einer kontinuierlichen Weiterentwicklung und Optimierung der Methodik, mit dem Ziel auch kleine Veränderungen sicher aufdecken zu können. Während ein Teil der Methodik über den gesamten Studienzeitraum konstant blieb, wurde ein anderer Teil der Messmethodik studienbegleitend weiter spezifiziert. Dabei ergaben sich für die einzelnen Teilstudien jeweils folgende Teilziele:

In der **ersten Teilstudie** wurde die Thrombozytenfunktion während einer stufenförmig ansteigenden Belastung untersucht. Der methodische Schwerpunkt richtete sich dabei auf die Frage, wie durch eine optimierte Probenaufbereitung eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten auf ein Minimum reduziert werden kann. Durch Parallelmessung von unfixierten sowie unterschiedlich fixierten Proben wurde der Einfluß der Fixierung auf das Messergebnis und eine mögliche Interaktion mit der Belastungsintervention analysiert. Der Einsatz von 4 verschiedenen Antikörpern (CD41, CD42b, CD62P und PAC-1) sollte eine detaillierte Beschreibung von Teilschritten einer möglichen Aktivierungsreaktion erlauben und diente der Suche nach einem geeigneten Aktivierungsmarker. Stimulationsversuche mit ADP und TRAP-6 zielten zusätzlich auf die Untersuchung der Thrombozytenreaktivität.

Darauf aufbauend setzte die **zweite Teilstudie** die Untersuchung der Aktivität und Reaktivität mit Hilfe der Marker CD41 und CD62P am Beispiel einer typischen Ausdauerbelastung fort. Darüber hinaus erfolgte der Aufbau einer eigenständigen Methodik zur Untersuchung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten und die Einführung der Messung von Konjugaten in die Untersuchung der belastungsinduzierten Thrombozytose.

Die **dritte Teilstudie** untersuchte erstmalig den Einfluß einer maximalen Kurzzeitbelastung auf die Thrombozytenfunktion. Die Auswahl dieser Belastungsform basierte auf der Frage, ob durch eine größt mögliche Belastungsintensität eine Aktivitätssteigerung provoziert werden kann. Der methodische Schwerpunkt lag auf dem weiteren Ausbau der Untersuchung von Konjugaten mit dem Ziel einer Differenzierung nach Subpopulationen der Leukozyten.

3 Material und Methoden

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht der Aufbau und die Weiterentwicklung einer durchflusszytometrischen Methodik zur differenzierten Untersuchung der Thrombozytenfunktion im Rahmen der belastungsinduzierten Thrombozytose. Die Arbeit basiert auf drei aufeinander aufbauenden Teilstudien und konzentriert sich gemäß dem Arbeitstitel auf die labor-methodischen Aspekte des Untersuchungsganges.

Die Studienteilnahme war freiwillig. Nach Aufklärung über Inhalte, Ablauf und mögliche Risiken der Studie gaben alle Probanden ihr schriftliches Einverständnis. Ein positives Votum der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena lag zu allen Teilstudien vor.

Für die Studienteilnahme galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien. In die Studie wurden nur männliche Nichtraucher im Alter zwischen 20 und 40 Jahren einbezogen. Alle Probanden sollten gesund und körperlich belastbar sein. Akute oder chronische Entzündungen mußten ausgeschlossen sein. Bestehende Erkrankungen des Immunsystems oder der Hämostase galten ebenso wie Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems als direkte Ausschlusskriterien. Darüber hinaus sollten keine Infektionen oder Impfungen in den letzten 4 Wochen vor Studienbeginn und während des Studienzeitraumes vorliegen. Die Einnahme von Medikamenten im angegebenen Zeitraum konnte nicht gestattet werden. Insbesondere die Einnahme von entzündungshemmenden oder die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Medikamenten musste zum direkten Ausschluß des Probanden führen, wie beispielsweise nichtsteroidale Antirheumatika, Steroidhormone, Antihistaminika, β -Lactam-Antibiotika, Cumarine oder Heparine. Als Referenzliste diente die Übersicht von GEORGE & SHATTIL 1991 (106).

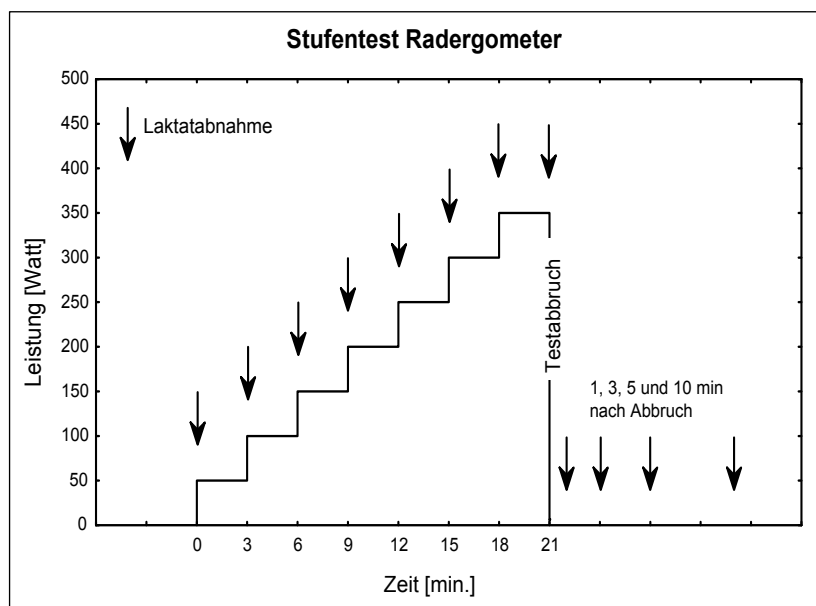
Während des Untersuchungszeitraumes sollten sich die Probanden ihren Gewohnheiten entsprechend normal ernähren und ausreichend schlafen. Allen Probanden war während des Studienzeitraumes ein normales, ihren Gewohnheiten entsprechendes Training gestattet. Auf größere sportliche Belastungen, wie besonders intensive oder extensive Trainingseinheiten oder gar Wettkämpfe außerhalb der Testanordnung, mußte verzichtet werden. An den letzten beiden Tagen vor einem Studientag war nur noch ein regeneratives Training bis zu einer Stunde erlaubt. Fehlende Compliance führte zum Ausschluss des betreffenden Probanden.

3.1 Eingangsuntersuchung

Ein- und Ausschlusskriterien wurden vor Beginn der einzelnen Studien in Form einer sportmedizinischen Leistungs- und Gesundheitsbeurteilung überprüft. Diese beinhaltete ein ärztliches Anamnesegespräch, eine körperliche Untersuchung, eine Routinelabor, ein Ruhe-EKG und eine Echokardiographie. Ferner absolvierten alle Probanden einen Stufentest auf

einem Radergometer einschließlich Laktatmessung, Spirometrie und Belastungs-EKG. Das Routinelabor bestand aus Blutbild, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Leberfermenten (GOT, GPT, γ -GT und Bilirubin), Creatinkinase, Kreatinin, Harnstoff, Gesamtcholesterin, Harnsäure, Nüchternblutzucker, C-reaktivem Protein, aktivierter partieller Thromboplastinzeit (aPTT), Prothrombinzeit (Quick/INR) sowie Urinstatus. Es wurde morgens zwischen 7 und 8 Uhr nüchtern abgenommen und im hauseigenen Labor ausgewertet. Die Ergebnisse der Anamnese und der körperlichen Untersuchung durch einen Arzt wurden in Standarduntersuchungsprotokollen dokumentiert. Ferner wurde der Körperfettanteil nach der Methode der Kalipermetrie nach PARIZKOVA gemessen (256). Eine Bestimmung des Herzvolumens erfolgte planimetrisch auf der Grundlage der Echokardiographie.

Bestanden nach der Gesundheitsbeurteilung keine Kontraindikationen, so schloß sich die Bestimmung der maximalen und submaximalen Leistungsfähigkeit an. Diese wurde entsprechend etablierter Ergometrie-Empfehlungen (175, 285) in Form eines Fahrradstufentests durchgeführt. Ausgehend von einer Startleistung von 50 Watt wurde die Leistung alle 3



Minuten um je 50 Watt gesteigert, bis die Belastung aufgrund von subjektiver Erschöpfung durch den Probanden abgebrochen wurde. Alle Tests wurden auf einem SRMTM-Radergometer durchgeführt.

Abbildung 3:
Testprotokoll Stufentest

Kapilläre Blutabnahmen zur Laktatmessung erfolgten in Ruhe, am Ende jeder Stufe, direkt bei Testende und nach jeweils 1, 3, 5, 10 Minuten aus dem mit Finalgon[®] hyperämisierten Ohrläppchen. Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Messung der Sauerstoffaufnahme aus der Atemluft mit dem Gerät Oxycon beta (Jaeger, Hoechberg – Germany). Zur kardiologischen Diagnostik wurde während der Ergometrie ein 12-Kanal-EKG aufgezeichnet und auf Rhythmusstörungen oder Zeichen einer Ischämie des Herzmuskels untersucht.

Die bei Testabbruch erreichte Leistung gibt die *maximale Leistungsfähigkeit* der Probanden im Stufentest wieder. Als Maß für die *submaximale Dauerleistungsgrenze* (63) wurde aus der

Laktat-Leistungskurve die *individuelle anaerobe Schwelle* (IAS) nach STEGMANN (309) bestimmt (Abb. 4).

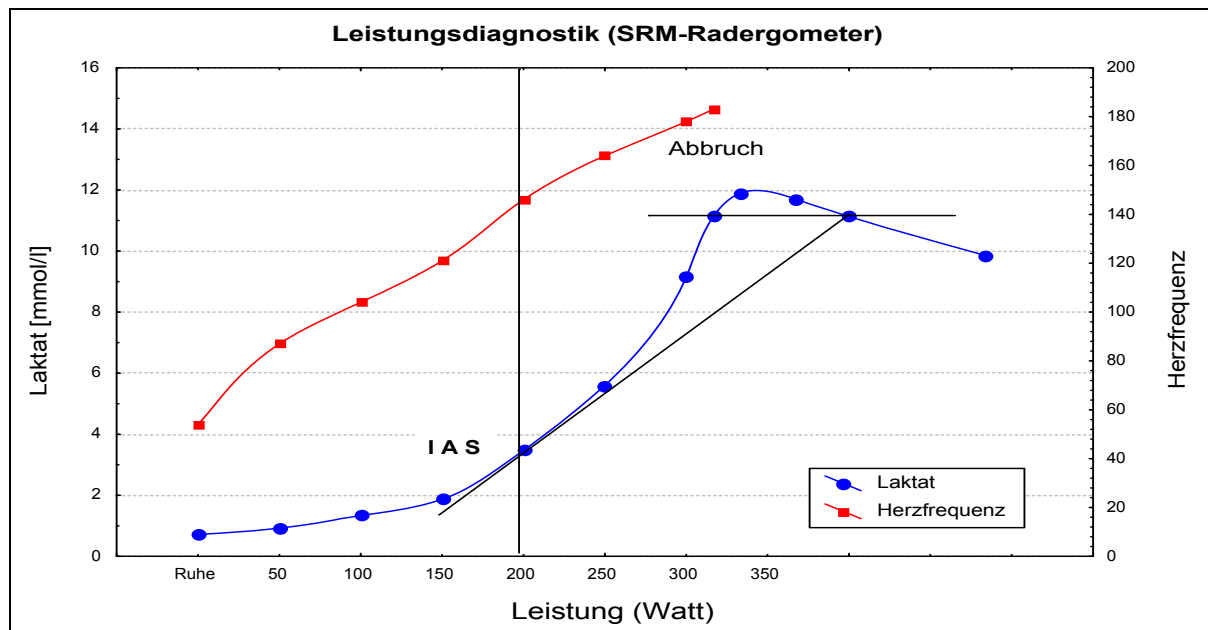


Abbildung 4: Bestimmung der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) nach Stegmann (309)

3.2 Belastungsuntersuchungen

Alle Belastungsuntersuchungen fanden unter standardisierten Umgebungsbedingungen eines Ergometrieräumes vormittags zwischen 8 Uhr und 12 Uhr statt. In Teilstudien mit mehreren Belastungsinterventionen wurden die Probanden jeweils zur individuell gleichen Tageszeit untersucht. Damit sollten Veränderungen der Thrombozyten- und Gerinnungsparameter aufgrund eines circadianen Rhythmus ausgeschlossen werden.

Am Untersuchungstag konnten die Probanden ein leichtes Frühstück zu sich nehmen, sollten dabei aber auf den Genuss von Kaffee oder schwarzem Tee verzichten. Der weitere Ablauf folgte dann immer dem gleichen Zeitschema. In einem kurzen Anamnesegespräch wurden die Probanden nach dem aktuellen Befinden, einer neu aufgetretenen Infektion oder der Einnahme von Medikamenten sowie der sportlichen Aktivität in den zurückliegenden Tagen befragt. Es folgte eine kurze körperliche Untersuchung und eine 30-minütige Ruhephase in liegender Position, um sicher zu stellen, dass alle Untersuchungen von den gleichen Ruhebedingungen ausgingen. Erst dann wurde mit den eigentlichen Belastungsuntersuchungen begonnen. Diese sahen im Einzelnen wie folgt aus.

3.2.1 Teilstudie I - Stufentestverfahren

Nach Abschluss der Eingangsuntersuchung bestand das eigentliche Studiendesign aus drei Interventionstagen in randomisierter Reihenfolge mit je einem Stufentest auf dem Radergo-

meter oder auf dem Laufband sowie aus einem Kontrollversuch mit gegenüber den Belastungstagen identischem Versuchsablauf aber ohne Belastungsintervention. Der Kontrollversuch sollte sicherstellen, dass mögliche Veränderungen in der Thrombozytenfunktion tatsächlich auf die Belastungsintervention zurückzuführen sind und nicht durch andere Einflüsse wie etwa einen Lagewechsel der Körperposition, psychische Anspannung vor Testbeginn, wiederholte Blutabnahmen oder sonstige Laborartefakte ausgelöst worden sind. In diesem Sinne diente der Kontrollversuch für die vorliegende Arbeit auch als Maß für die Sensitivität der entwickelten durchflusszytometrischen Methodik. Die drei Untersuchungstage lagen innerhalb eines Zeitraumes von 2 Wochen mit einem Mindestabstand von 4 Tagen zwischen den einzelnen Untersuchungen.

Die Auswahl einer stufenförmig ansteigenden Belastung orientierte sich daran, dass Stufentestverfahren zur Bestimmung der maximalen und submaximalen Leistungsfähigkeit die häufigste Belastungsform der sportmedizinischen Leistungsdiagnostik darstellen (128, 175). Darüber hinaus sollte im Rahmen der übergreifenden Fragestellung der Gesamtstudie (136) dem Widerspruch nachgegangen werden, dass KESTIN et al. nach einer stufenförmig ansteigenden Belastung eine Zunahme der Thrombozytenaktivität nur bei Untrainierten beobachten konnten (170), während von MÖCKEL et al. eine entsprechende Zunahme auch für gut trainierte Probanden beschrieben wurde (233).

Der Stufentest auf dem Radergometer wurde in identischer Form zur Eingangsuntersuchung mit einer Stufendauer von 3 Minuten und einer Stufenhöhe von 50 Watt durchgeführt. Kapilläre Blutentnahmen zur Laktatmessung erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten. Während des gesamten Testablaufs wurde die Herzfrequenz kontinuierlich mit einer Pulsuhr (Polar Electronics, Hamburg - Germany) aufgezeichnet und festgehalten.

Das Protokoll des Laufbandstufentests sah eine Anfangsgeschwindigkeit von 2 m/s und eine Stufendauer von ebenfalls 3 Minuten vor. Anschließend wurde die Laufgeschwindigkeit alle 3 Minuten um weitere 0,5 m/s gesteigert, bis der Test durch den Probanden aufgrund subjektiv empfundener Erschöpfung abgebrochen wurde. Für die kapillären Blutentnahmen zur Laktatmessung wurde das Laufband nach jeder Stufe für ca. 30 Sekunden gestoppt. Weitere Abnahmen erfolgten in Ruhe, nach der letzten Stufe sowie jeweils 1, 3, 5, 10 Minuten nach Belastungsende. Die gemessenen Laktatwerte und Herzfrequenzen dienten zur Bestimmung der Belastungsintensität.

Am Kontrolltag wurden die Studienteilnehmer in identischer Weise vorbereitet – so als ob sie eine Fahrradergometrie zu absolvieren hätten. Anstelle eines Stufentests bestand nun die Aufgabe darin, für 20 Minuten ruhig auf dem Fahrradergometer sitzen zu bleiben. Die Sitzzeit

von 20 Minuten entspricht in etwa der Dauer eines Stufentestes. Auch hier wurde die kapilläre Laktatkonzentration vor Beginn und nach Testende bestimmt und eine Aufzeichnung der Herzfrequenz vorgenommen.

Alle Probanden erfuhren erst unmittelbar vor Testbeginn welche Belastungsintervention am jeweiligen Versuchstag zu absolvieren war. Jeder Untersuchung schloss sich eine 1-stündige Ruhephase in liegender Position an. Während des Untersuchungsablaufs war den Probanden eine Flüssigkeitsaufnahme gestattet.

Die venösen Blutentnahmen zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion und weiterer Parameter erfolgten nach der anfänglichen 30-minütigen Ruhephase in liegender Position (A), nach etwa 20 Minuten Testvorbereitung in aufrechter Position direkt vor Testbeginn (B), unmittelbar nach Testende in ebenfalls aufrechter Position (C), sowie 1 Stunde nach Testende in liegender Position (D).

3.2.2 Teilstudie II - Dauertest

Die Belastungsintervention in Teilstudie II bestand aus einem Dauerlauf über mindestens 60 und maximal 120 Minuten bei einer Intensität von 90 % der *individuellen anaeroben Schwelle* (IAS) auf dem Laufband. Während die in Teilstudie I untersuchten Stufentestverfahren in erster Linie im Rahmen der Leistungsdiagnostik Verwendung finden, stellt ein Dauerlauf von 60 Minuten eine typische Trainingseinheit des Ausdauertrainings dar. Die gewählte Belastungsintensität von 90 % der IAS entspricht dem Übergangsbereich von der extensiven zur intensiven Dauermethode (346). Je nach verwendeter Nomenklatur kann sie auch dem Bereich der Grundlagenausdauer II (244) oder dem sogenannten Entwicklungsbereich zugeordnet werden (209). Innerhalb der vorliegenden Teilstudie sollte die gewählte Belastungsintensität einerseits einen ausreichend hohen Belastungsreiz garantieren und andererseits auch eine Belastungsdauer von mindestens 60 Minuten ermöglichen.

Zur Bestimmung der Laufgeschwindigkeit an der IAS erfolgte im Gegensatz zur vorausgegangenen Teilstudie die Leistungsbeurteilung im Rahmen der Eingangsuntersuchung nicht auf dem Radergometer sondern auf dem Laufband. Diese wurde identisch zu dem bereits oben beschriebenen Protokoll des Laufbandstufentests durchgeführt.

Am eigentlichen Versuchstag wurden allen Probanden nach der vorausgegangenen Ruhephase unmittelbar vor Testbeginn nochmals auf eine Belastungsdauer von mindestens 60 und maximal 120 Minuten hingewiesen. Ausgehend von einer Laufbandgeschwindigkeit von 2 m/s wurde dann die Geschwindigkeit über 2-3 Minuten allmählich auf die vorgegebene Testgeschwindigkeit von 90 % der IAS gesteigert. Die langsame Steigerung der Laufgeschwindigkeit ermöglicht dem Herz-Kreislauf-System eine gleichmäßige Anpassung an die

Zielbelastung. Damit sollte eine überschießende Kreislaufreaktion verhindert werden, welche sich bei zu abrupter Belastungssteigerung auf Grund eines anfänglichen Sauerstoffdefizits leicht einstellt (173). Nach Erreichen der Geschwindigkeitsvorgabe wurde diese für die gesamte Testdauer konstant gehalten. Der Test endete mit Belastungsabbruch durch den Probanden oder nach einer maximalen Testdauer von 120 Minuten. Während der gesamten Testdauer wurde die Herzfrequenz kontinuierlich aufgezeichnet (Polar Electronics). Kapilläre Blutabnahmen zur Laktatmessung erfolgten unmittelbar vor Testbeginn und nach Testende. Während der Laufbandbelastung war den Probanden eine ihren Bedürfnissen entsprechende Flüssigkeitssubstitution gestattet. Ein Kontrollversuch konnte aus organisatorischen Gründen nicht realisiert werden.

Dem Testende schloss sich eine Ruhephase von 2 Stunden an. In dieser Zeit hatten die Teilnehmer die Möglichkeit, sich zu duschen und etwas Nahrung und Flüssigkeit aufzunehmen. Die venöse Blutentnahme zur Analyse der Thrombozytenfunktion erfolgte jeweils nach einer 30-minütigen Ruhephase vor Testbeginn (Ruhe), unmittelbar nach Testende (Belastung) sowie 2 Stunden nach Belastungsende (2 h Ruhe). Alle Blutentnahmen wurden in liegender Position durchgeführt.

3.2.3 Teilstudie III - Kurzzeitbelastung

Innerhalb von 2 Wochen nach einer wie oben beschriebenen Leistungs- und Gesundheitsbeurteilung folgten die eigentlichen Belastungsuntersuchungen in Form eines maximalen Kurzzeittests über 90 Sekunden auf einem drehzahlkontrollierten SRMTM-Radergometer (90-Sekunden Test) und eines Kontrollversuchs mit identischem Versuchsablauf jedoch ohne eigentliche Belastungsintervention. Die Reihenfolge der Testtage wurde zufällig festgelegt. Zwischen den Versuchen lagen mindestens 72 Stunden.

Für die Auswahl des Testverfahrens waren hauptsächlich zwei Gründe ausschlaggebend. Zum einen war der Einfluss einer Kurzzeitbelastung auf die Thrombozytenfunktion bislang kaum untersucht und zum anderen sollte durch die maximale Belastungsintensität eine größtmögliche Stimulationswirkung erreicht werden. Wie keine andere Belastungsform provoziert eine hochintensive Kurzzeitbelastung innerhalb kürzester Zeit dramatische Veränderungen des Stoffwechsels und der Kreislauffunktion. In Folge der überwiegend anaeroben Energiebereitstellung kommt es über die Bildung von Laktat zu einem Abfall des pH-Wertes (143, 172). Gleichzeitig darf angesichts der hohen Kreislaufbelastung auch von einer Zunahme der im Gefäßbett wirksamen Scherkräfte ausgegangen werden. Die bekannte starke Freisetzung der Hormone Adrenalin und Noradrenalin gibt einen weiteren Hinweis auf die außergewöhnlich hohe Beanspruchung des Organismus (174, 314). Sowohl einem Abfall des pH-

Wertes (43, 114) als auch einer Zunahme von Scherkräften (45, 232, 324, 351) oder der Wirkung der Katecholamine (6, 164) wird eine aktivierende Wirkung auf die Funktion der Blutplättchen zugeschrieben. Die Festlegung der Belastungszeit auf 90 Sekunden zielte auf eine höchstmögliche Beanspruchung des Organismus. Dabei entspricht eine Testdauer von 90 Sekunden aufgrund praktischer Trainingserfahrung bei sogenannten maximalen *all-out-Tests* der Grenze dessen, was von den Probanden entsprechend geleistet werden kann.

Der Ablauf an den einzelnen Versuchstagen begann wiederum mit einer 30-minütigen Ruhephase im Liegen. Zur muskulären Vorbereitung auf die anstehende Belastung und zur Verletzungsprophylaxe absolvierten alle Teilnehmer anschließend eine standardisierte Aufwärmphase von 15 Minuten mit einer Intensität von 50 % der IAS. Dies entspricht einer sehr geringen Belastungsintensität, welche selbst gegenüber den Vorgaben für ein Regenerations-training (63, 243, 359) als unerschwerlich eingestuft werden muss. Ein relevanter Einfluss auf die Thrombozytenfunktion durch die Aufwärmphase sollte damit ausgeschlossen werden. Die eigentliche Belastungsintervention bestand aus einer 90-sekündigen Maximalbelastung (*all-out*). Alle Versuche wurden auf einem isokinetischen SRMTM-Radergometer bei konstanter Trittfrequenz von 90 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Das SRMTM Ergometersystem erlaubt dem einzelnen Probanden das Abrufen seiner maximalen Leistung bei einer konstanten Trittfrequenz, indem es kontinuierlich den Trittwiderstand den verbliebenen Kraftreserven anpasst. Gleichzeitig bietet es über die kontinuierliche Aufzeichnung der Kraft eine genaue und verlässliche Messung der erbrachten Leistung (14). Abbildung 5 gibt exemplarisch den zeitlichen Verlauf von Leistung, Herzfrequenz und Trittschwindigkeit während des 90-Sekunden-Testes eines Probanden wieder.

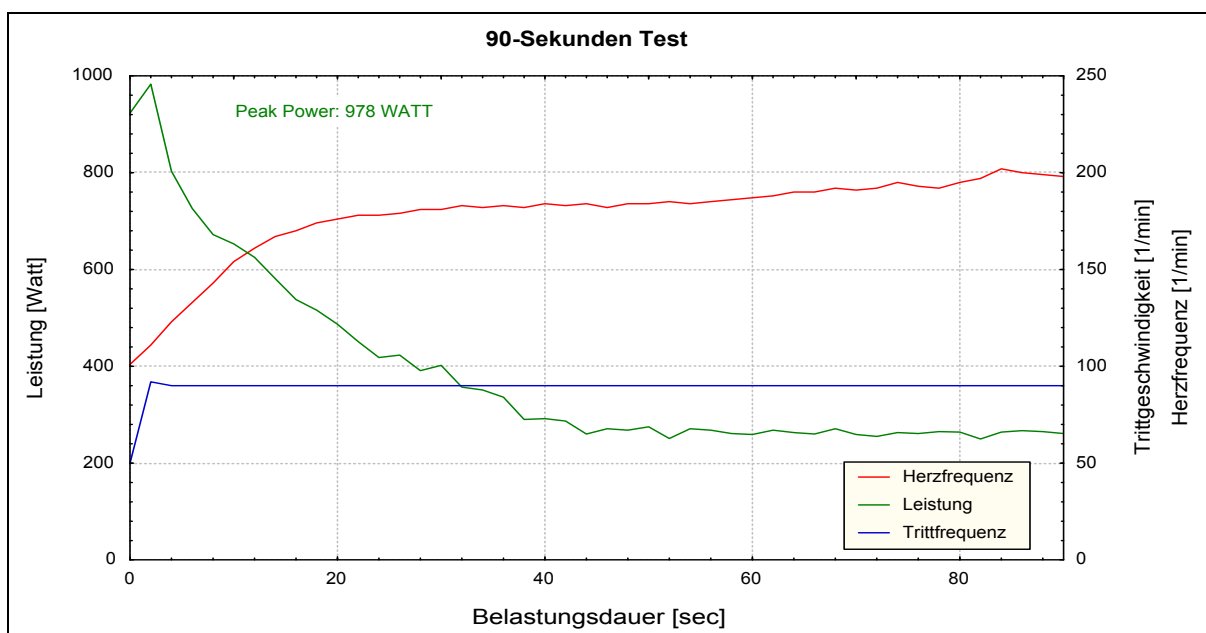


Abbildung 5: Belastungsprotokoll 90-Sekunden Test

Unmittelbar nach Testende verließen die Probanden das Ergometer und legten sich zur Prävention einer Kreislaufdysregulation auf eine Untersuchungsliege. Kapilläre Blutabnahmen zur Laktatmessung wurden vor Testbeginn sowie 1, 3, 5 Minuten nach Testende entnommen. Während des gesamten Testablaufes erfolgte die kontinuierliche Aufzeichnung der Herzfrequenz mit Hilfe konventioneller Pulsuhren mit Brustgurt (Polar Electronics).

Der Kontrollversuch folgte einem identischen Ablauf einschließlich der 15-minütigen Aufwärmphase. Erst jetzt erfuhren die Probanden, dass am heutigen Tage keine Belastung statt fand. Sie verbrachten nun 90 Sekunden auf dem Ergometer in ruhig sitzender Position und wurden danach ebenfalls auf die Untersuchungsliege gelegt.

Venöse Blutentnahmen zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion und weiterer Parameter erfolgten nach der 30-minütigen Ruhephase (Ruhe), nach dem Aufwärmen (warm-up), unmittelbar nach Testende (Belastung), sowie nach jeweils 15 Minuten (15 min) und 60 Minuten (60 min) Ruhe im Anschluss an das Testende. Alle Blutentnahmen wurden in liegender Position durchgeführt.

Die Festlegung der Abnahmezeitpunkte nach Belastungsende basierte auf einem Vorversuch mit vier Probanden. Diesen war jeweils 0, 3, 7, 12, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten nach einem 90-Sekunden-Test über einen Venenverweilkatheter am Unterarm Blut entnommen worden. Dabei hatte sich gezeigt, dass das der maximale Anstieg der Thrombozytenzahl erst zwischen 12 und 20 Minuten nach Belastungsende zu erwarten war, während sich eine Zunahme der Reaktivität der Thrombozyten bereits unmittelbar nach Belastungsende andeutete.

3.3 Probandendaten

In der ersten Teilstudie durchliefen insgesamt 14 männliche Nichtraucher im Alter zwischen 20 und 27 Jahren die Leistungs- und Gesundheitsbeurteilung. Alle Probanden waren gesund und körperlich voll belastbar. Verletzungen der getroffenen Ein- und Ausschlusskriterien lagen nach der Eingangsuntersuchung nicht vor. Während des Studienzeitraumes musste ein Proband aufgrund der Einnahme von Aspirin® nachträglich ausgeschlossen werden, sodass schließlich 13 Probanden die komplette Studie absolvierten. An der zweiten Teilstudie beteiligten sich 17 männliche Nichtraucher im Alter zwischen 21 und 40 Jahren. Wie schon für Teilstudie I gaben die Probanden an, seit mehreren Jahren regelmäßig körperlich aktiv zu sein. Alle Teilnehmer waren gesund und voll belastbar. Gründe für einen nachträglichen Ausschluss ergaben sich nicht. Für die dritte Teilstudie konnten schließlich 15 männliche und regelmäßig körperlich aktive Nichtraucher gewonnen werden. Verletzungen der getroffenen Ein- und Ausschlusskriterien lagen nicht vor. Alle Teilnehmer absolvierten die komplette Untersuchung. Tabelle 1 fasst die Daten der drei Studiengruppen zusammen.

Tabelle 1: anthropometrische Daten der Studienteilnehmer [Mittelwert \pm Standardabw.; Minimum – Maximum]

| | Alter [Jahre] | Größe [cm] | Gewicht [kg] | Körperfett [%] | rel. Herzvolumen [ml/kg] |
|----------------|-------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Teilstudie I | 23 \pm 2 | 181 \pm 7 | 73 \pm 9 | 9,4 \pm 2,6 | 12,0 \pm 1,5 |
| | 20 - 27 | 173 - 197 | 58 - 86 | 6,0 - 14,6 | 8,1 - 14,0 |
| Teilstudie II | 27 \pm 6 | 182 \pm 6 | 78 \pm 8 | 12,6 \pm 4,0 | 11,1 \pm 0,8 |
| | 21 - 40 | 172 - 192 | 62 - 88 | 5,7 - 19,1 | 9,6 - 12,8 |
| Teilstudie III | 24 \pm 2 | 178 \pm 7 | 71 \pm 7 | 12,5 \pm 4,4 | 11,3 \pm 1,2 |
| | 21 - 27 | 172 - 197 | 62 - 87 | 7,1 - 20,2 | 9,1 - 13,7 |

Nach ROST / HOLLMANN gilt die maximale Sauerstoffaufnahmefähigkeit nach wie vor als *das Bruttokriterium der kardiopulmonalen und metabolischen Leistungsfähigkeit* (285). Die Absolutwerte für die höchste erreichte Sauerstoffaufnahme ($\text{VO}_{2\text{max}}$) besitzen eine starke Abhängigkeit vom Körpergewicht und der eingesetzten Muskelmasse des einzelnen Athleten. Es wird daher empfohlen, die gemessenen Absolutwerte auf das Körpergewicht zu beziehen und diese als relative Sauerstoffaufnahme anzugeben (143, 172, 175). Für männliche Normalpersonen zwischen 20 und 30 Jahren wird ein Normbereich von 40 bis 45 ml/min/kg angegeben (175). Mit einer relativen $\text{VO}_{2\text{max}}$ zwischen 56,1 und 59,1 [ml/min/kg] lagen die untersuchten Probandengruppen jeweils deutlich über dem angegebenen Normbereich. Sie sind dementsprechend als überwiegend gut bis sehr gut trainiert einzustufen (Tab. 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der Leistungsbeurteilungen; maximale Wattleistung (P_{max}), individuelle anaerobe Schwelle (IAS), maximale Sauerstoffaufnahme ($\text{VO}_{2\text{max}}$) sowie relative $\text{VO}_{2\text{max}}$; maximales Laktat ($\text{Laktat}_{\text{max}}$) und maximale Herzfrequenz (HF_{max}); [Mittelwert \pm StAbw.; Minimum – Maximum]

* Ergebnisse aus Laufbandstufentest

| | P_{max} [W] | IAS [W] | $\text{VO}_{2\text{max}}$ [ml/min] | rel. $\text{VO}_{2\text{max}}$ [ml/min/kg] | $\text{Laktat}_{\text{max}}$ [mmol/l] | HF_{max} [l/min] |
|-----------------|---|-------------------|---|---|--|---|
| Teilstudie I | 322 \pm 56 | 227 \pm 59 | 4290 \pm 810 | 59,1 \pm 6,5 | 11,1 \pm 2,1 | 191 \pm 9 |
| | 250 - 417 | 150 - 334 | 3330 - 5760 | 44,2 - 68 | 7,1 - 13,8 | 182 - 205 |
| Teilstudie II * | / | / | 4350 \pm 590 | 56,4 \pm 5,9 | 9,4 \pm 1,3 | / |
| | / | / | 3190 - 5320 | 43,0 - 66,4 | 8,1 - 12,0 | / |
| Teilstudie III | 281 \pm 69 | 186 \pm 67 | 3980 \pm 710 | 56,1 \pm 8,2 | 11,9 \pm 2,8 | 189 \pm 12 |
| | 217 - 450 | 106 - 343 | 2990 - 5620 | 44,2 - 70,8 | 7,2 - 15,6 | 165 - 200 |

Als weiteres Maß für die körperliche Leistungsfähigkeit kann auch die maximal erreichte Leistung sowie die Leistung an der IAS herangezogen werden. Aufgrund der Abhängigkeit vom Körpergewicht sollte auch diese Leistung als Relativwert angegeben werden. Die entsprechenden Normwerte für männliche Normalpersonen zwischen 20 und 30 Jahren liegen bei ca. 2 [Watt/kg] an der IAS und ca. 3 [Watt/kg] bei Ausbelastung. Mit einer mittleren Leistung von 3,1 [Watt/kg] an der IAS und 4,4 [Watt/kg] bei Testabbruch übertrafen die

Probanden der ersten Teilstudie diese Normwerte deutlich. Die entsprechenden Werte der dritten Teilstudie lagen mit durchschnittlich 2,6 [Watt/kg] an der IAS bzw. 4,0 [Watt/kg] bei Testabbruch zwar etwas unter den Werten der Vorstudie aber immer noch klar über den angegebenen Normwerten. Innerhalb des Laufbandstufentests erreichten die Teilnehmer der zweiten Teilstudie eine maximale Laufgeschwindigkeit von $4,4 \pm 0,3$ [m/s]. Die mittlere Laufgeschwindigkeit an der IAS wurde auf $3,5 \pm 0,4$ [m/s] bestimmt. Das entspricht in etwa der durchschnittlichen Laufleistung von Spielern der Fußball-Oberliga (63).

3.4 Probengewinnung und allgemeine Labormethoden

Alle **venösen Blutabnahmen** erfolgten aus Unterarm- bzw. Ellenbeugevenen mit einer weiltumigen Kanüle (20 G; Sarstedt) bei möglichst atraumatischer Punktion. Eine leichte venöse Stauung von 40 mmHg wurde mittels einer Blutdruckmanschette am Oberarm für weniger als 30 Sekunden vor Punktionsbeginn vorgenommen. Der manuell aufgebaute Sog wurde so gering gehalten, dass eine 10 ml-Monovette in etwa 10 Sekunden gefüllt wurde. Von Abnahme zu Abnahme wurde zwischen linkem und rechtem Arm gewechselt und versucht, jeweils eine neue Vene zu punktieren. War dies nicht möglich, so erfolgte eine erneute Punktion grundsätzlich distal einer früheren Einstichstelle. Hierdurch sollte eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten möglichst gering gehalten werden.

Das Füllen der einzelnen Monovetten folgte dem immer gleichen Ablauf. Die ersten 3 ml Blut wurden auf eine Serum-Monovette aufgezogen und wie für Gerinnungsuntersuchungen üblich verworfen. Das erste eigentliche Probenröhrchen war eine 10 ml 3-Natrium-Citrat-Monovette (3,8 %) für serologische Untersuchungen. Dann folgte eine 2,9 ml 3-Natrium-Citrat-Monovette (3,8 %) zur Thrombozytendiagnostik und eine 10 ml Lithium-Heparin-Monovette (15 i.E./ml; jeweils Sarstedt, Nümbrecht - Germany) für die Bestimmung von Katecholaminen. In allen Monovetten war das Antikoagulant in einem Volumenanteil von 1:10 vorgelegt. Durch behutsames Schwenken unmittelbar nach Abnahme wurde auf eine gute Durchmischung von Blut und Antikoagulant geachtet. Alle Monovetten wurden unmittelbar nach Abnahme zur sofortigen Aufbereitung ins Labor überstellt.

Kapilläre Blutentnahmen zur **Laktatmessung** erfolgten aus dem mit Finalgon® (Boehringer Ingelheim - Germany) hyperämisierten Ohrläppchen in eine 20 µl Glaskapillare. Diese wurde unmittelbar nach der Blutabnahme in einem verschließbaren Reaktionsgefäß mit 1 ml EBIO/ESAT-Systemlösung® ausgeschüttelt und chemisch fixiert. Die Messung erfolgte dann innerhalb von 6 Stunden auf der Grundlage der Amperometrie nach der LOD-Methode am EBIO basic® Gerät (jeweils Eppendorf, Hamburg - Germany). Die Messgenauigkeit wird vom Hersteller für einen Referenzwert von 2 mmol/l auf $< 3 \%$ angegeben.

Die **Adrenalin-** und **Noradrenalin**konzentration im Plasma wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach der von FOTI et al. 1987 beschriebenen Methode bestimmt (86). Dazu wurde die Lithium-Heparin-Monovette unmittelbar nach der Blutabnahme auf Eis gelagert und innerhalb von 5 Minuten mit 1000 g für 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5810R). Das überstehende Plasma wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bis zur eigentlichen Messung bei –80 °C schockgefroren. Für die Bestimmung wurden 2 ml des Plasmas mit 1 ml TRIS-Puffer (pH 8,6), 200 µl eines internen Standards und 40 mg Aluminiumoxid versetzt, 5 Minuten geschüttelt und 2 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml HPLC-Lauflüssigkeit (alles BioRad, München - Germany) durch 15 Sekunden Vortexen aufgenommen, erneut 2 Minuten mit 1000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. In dem verbliebenen Pellet wurden die Katecholamine mit 150 µl 0,1 molarer Phosphorsäure von dem Aluminiumoxid desorbiert. 50 µl dieser Lösung wurden mit einer Mikrospritze in die analytische Säule gegeben und mittels HPLC (BioRad) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt über die Chromoline-Software (BioRad) nach vorausgegangener Messung eines Nullwertes, einer Standardkurve und zweier Kontrollen. In Ruhe werden die Normbereiche für die AdrenalinKonzentration im Plasma bei 10-196 [pg/ml] und für Noradrenalin bei 78-521 [pg/ml] angegeben (317). Für diesen Normbereich wurden folgende Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten bestimmt:

| | <i>Intraassay-Variationskoeffizienten</i> | <i>Interassay-Variationskoeffizienten</i> |
|--------------|---|---|
| Adrenalin | 11,1% | 14,6 % |
| Noradrenalin | 1,5 % | 2,1 % |

Thrombozytenzahl [Gpt/l] und **mittleres Thrombozytenvolumen** [fl] wurden über ein maschinelles Blutbild (Coulter A^CTdiff., Couter Electronics, Krefeld - Germany) auf der Grundlage der Impedanzmessung bestimmt. Die Messung erfolgte innerhalb von 3 Minuten nach Blutabnahme aus dem mit Na-Citrat antikoagulierten Blut (2,9 ml Monovette) bei Raumtemperatur. Der Hersteller macht folgende Angaben zu den Variationskoeffizienten von Reliabilität und Validität des Blutbildautomaten:

| | VK _{Reliabilität} | VK _{Validität} |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Plättchenzahl (50-250 Tsd/µl) | < 7 % | < 10 % |
| Plättchenzahl (250-500 Tsd/µl) | < 5 % | < 7 % |
| mittleres Plättchenvolumen (5-20 fl) | < 3 % | < 5 % |
| Hämatokrit | < 3 % | < 3 % |

Für die Bestimmung des **löslichen P-Selektins** im Plasma wurde die 10 ml Na-Citrat Monovette unmittelbar nach der Blutabnahme auf Eis gelegt und innerhalb von 5 Minuten mit 1000 g für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5810R). Der Überstand wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) verteilt und bis zur Messung bei –80 °C schockgefroren. Die Messung erfolgte auf der Grundlage eines *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Der verwendete Test-Kit für humanes lösliches P-Selektin (Parameter® - human soluble P-Selectin Immunoassay; R&D Systems, Wiesbaden - Germany) basiert auf einem Sandwich-Prinzip, bei dem humanes lösliches P-Selektin über einen spezifischen monoklonalen Antikörper an die Wand einer Mikrotiterplatte gebunden und durch einen weiteren enzymgekoppelten Antikörper (Meerrettich-Peroxidase) markiert wird. Nach wiederholtem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper wird dann die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase durch enzymatische Umsetzung eines chromogenen Substrates photometrisch bestimmt. Eine Quantifizierung der P-Selektin-Konzentration in den Proben ist mit Hilfe einer Standardkurve möglich, die aus der Parallelmessung eines Nullwertes und von 5 Standardproben mit jeweils bekannter Konzentration bestimmt wird.

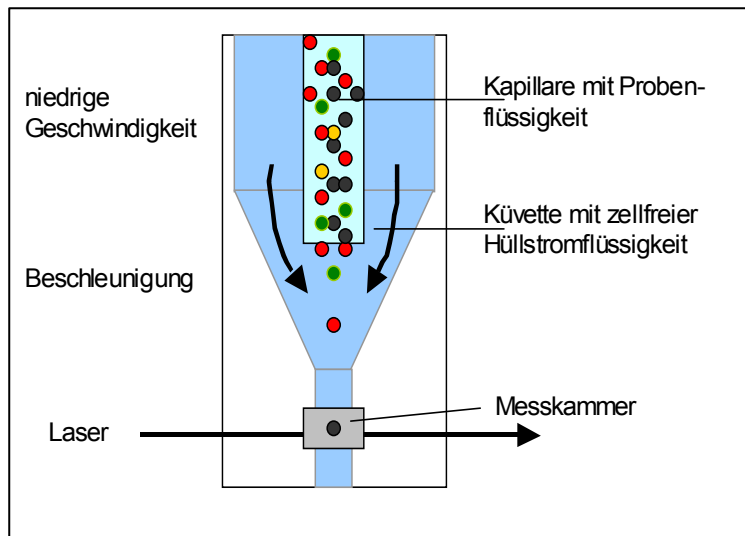
Die Durchführung des ELISA erfolgte streng nach den Herstellerangaben. Die Standardkurve wurde durch eine Dreifachbestimmung erstellt und alle Proben zusammenhängend gemessen. Vom Hersteller wird für Citrat-Plasma ein Normbereich von 18-40 ng/ml für gesunde Normalpersonen angegeben. Ferner finden sich folgende Angaben zur Testvariabilität:

| | <i>Intraassay-Variationskoeffizient</i> | <i>Interassay-Variationskoeffizient</i> |
|----------------------|---|---|
| lösliches P-Selektin | 4,9 – 5,6 % | 7,9 – 9,9 % |

3.5 Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer lässt sich vereinfacht als automatisiertes Fluoreszenzmikroskop beschreiben, welches auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften und Fluoreszenzen von Zellen erfassen kann (315). Dadurch können sehr große Zellzahlen in sehr kurzer Zeit analysiert werden. Das Messprinzip basiert darauf, dass die Zellen der zu untersuchenden Probensuspension zunächst vereinzelt und in der Messkammer dann nacheinander im senkrechten Fluß durch einen Laserstrahl geführt werden. Dies erfolgt nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung (111, 270). Das Kernprinzip dieses aufwendigen Flüssigkeitssystems ist in Abb. 6 wiedergegeben. Durch ein äußeres Drucksystem wird die zu untersuchende Probenflüssigkeit in eine Kapillare geführt, die von einer zellfreien Flüssigkeit umspült wird. Diese Hüllstromflüssigkeit nimmt die Zellen aus der Kapillare in ihrer Laufrichtung mit und bewirkt eine Verdünnung. Die weitere Vereinzelung erfolgt dann

dadurch, dass sich der Zylinder der Hüllstromflüssigkeit auf die Messkammer hin immer weiter verengt. So wird eine starke Beschleunigung der Flussgeschwindigkeit erreicht und der



Abstand zwischen den Zellen vergrößert sich. Die Flußgeschwindigkeit und damit auch die Zahl der pro Zeiteinheit gemessenden Zellen ist durch ein aufwendiges Drucksystem von außen steuerbar.

Abbildung 6:
Prinzip der hydrodynamischen
Fokussierung nach (315)

Durchlaufen in der Messkammer die Zellen den Laserstrahl, so wird das Licht gebrochen bzw. gestreut. Die Streuung des Lichtes erfolgt nicht gleichmäßig in alle Richtungen und ist von den morphologischen Eigenschaften der Zellen abhängig (270, 315). Die in einem kleinen Winkel zur Richtung des Laserstrahles gebrochenen Lichtstrahlen werden als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) bezeichnet. Die Messung erfolgt je nach Gerätehersteller in einem Winkel zwischen 0° - 10° (315) und 2° - 20° (111). Die Höhe des FSC ist in erster Linie von der Querschnittsfläche der Zelle abhängig und gibt damit wichtige Informationen über die

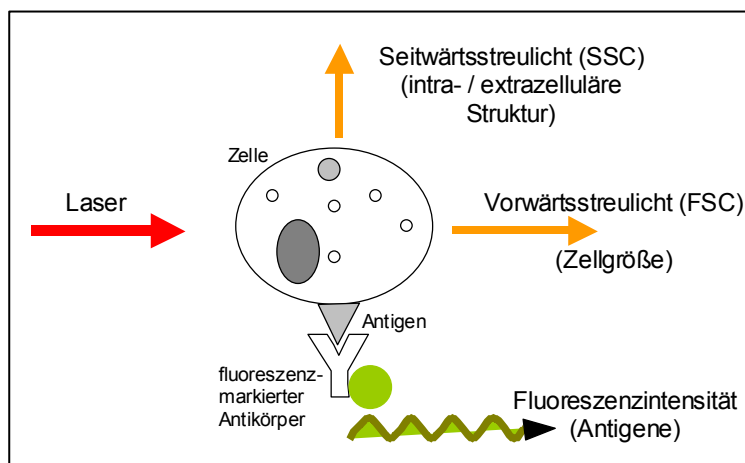


Abbildung 7: messbare Zelleigenschaften nach (315)

Zellgröße (270, 315). Das in einem Winkel von 90° gebrochene Streulicht wird als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) bezeichnet. Die Stärke des SSC wird weniger durch die reine Zellgröße als viel mehr durch die Menge der in der Zelle enthaltenen Granula und Membranfaltungen bedingt. Dabei ist zu beachten,

dass FSC und SSC nicht unabhängig voneinander sind und dass Zellgröße und Granularität nur über einen begrenzten Bereich eine lineare Beziehung zum Streulicht besitzen.

Durch den Einsatz spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich Zellen weit über die Möglichkeiten der reinen Streulichteigenschaften hinaus charakterisieren. Eine wichtige Methode, um das Vorhandensein bzw. die Anzahl bestimmter Glykoproteine auf der Zell-

oberfläche zu bestimmen, ist die direkte Immunfluoreszenzmarkierung. Dazu werden die Zellen mit spezifischen Antikörpern für die zu untersuchenden Glykoproteine (Antigene) inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff, mit dem diese Antikörper zuvor konjugiert worden sind, wird beim Durchgang der Zelle durch den Laser angeregt und emittiert dann Licht mit einer für ihn typischen Wellenlänge. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert eng mit der Anzahl der gebundenen Antikörper (268, 269, 315). Bei Einsatz unterschiedlicher Antikörper mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen sind auch Mehrfarbanalysen in einem einzelnen Probenansatz möglich. Abbildung 8 zeigt beispielhaft den Aufbau eines Durchflußzytometers für eine 4-Farbanalyse.

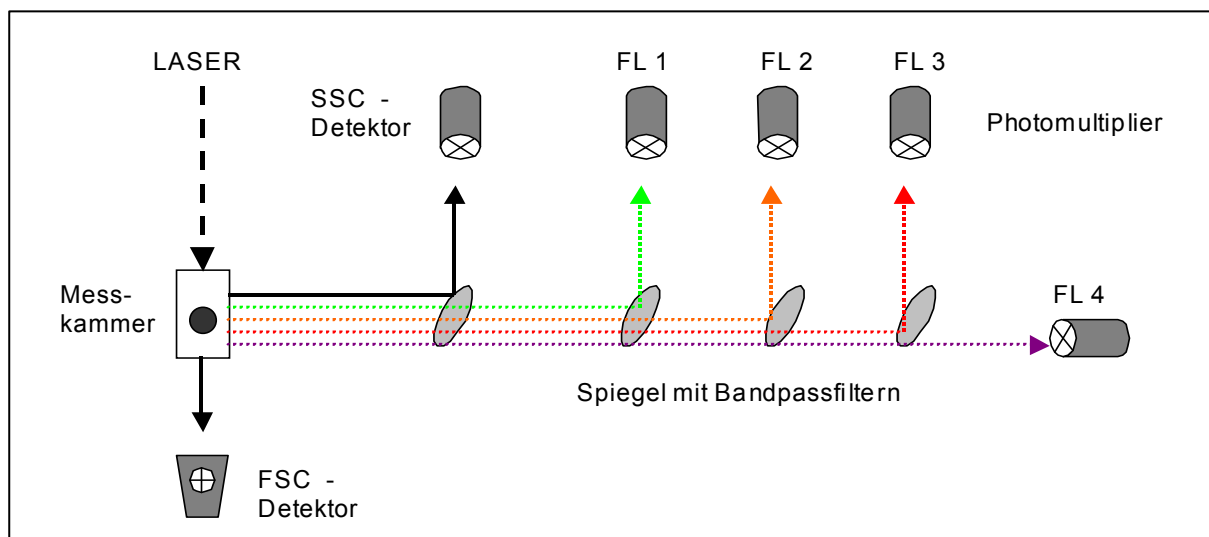


Abbildung 8: Strahlengang einer 4-Farbanalyse eines Durchflußzytometers nach (315)

Das optische System aus Blenden, Filtern, Spiegeln und Linsen teilt das Seitwärtsstreulicht vom Fluoreszenzlicht und trennt dieses anschließend in verschiedene Farbbereiche auf. Die Messung der Lichtintensität erfolgt dann mit hochsensitiven Photomultipliern, die je nach vorwählbarer Einstellung das gemessene Signal um Faktor 10^3 bis über 10^7 verstärken. Für die Messung des Vorwärtsstreulichtes genügt meist eine Photodiode, die das gemessene Lichtsignal direkt in einen elektrischen Puls umwandelt, welcher dann erst im Nachgang elektronisch verstärkt wird (111). Je nach Aufgabenstellung lassen sich die einzelnen Signale linear oder logarithmisch verstärken.

Ein komplexes elektronisches und computergestütztes System trennt die tatsächlich gemessenen Pulse vom Hintergrundrauschen und synchronisiert die Signale, die jeweils zu einer Zelle gehören. Von einem Analog-/Digitalwandler werden die als Spannungsintensitäten registrierten Signalstärken einem digitalen Meßwert zugeordnet und anschließend gespeichert. Für diese Speicherung, ähnlich einer Intervallskala, ist heute eine Auflösung von 1024 Kanälen für jedes gemessene Merkmal üblich (270, 315).

3.5.1 Teilstudie I – Messung von Thrombozytenaktivität und -reaktivität

Im Mittelpunkt der ersten Teilstudie stand der Aufbau und die Weiterentwicklung einer eigenständigen Methodik zur Untersuchung der Thrombozytenaktivität und -reaktivität. Alle Messungen wurden jeweils nach der Methode der direkten Immunfluoreszenzmarkierung in Doppelfärbung mit CD41/CD62P bzw. CD42b/PAC-1 aus dem Vollblut durchgeführt. Dabei wurden die plättchenspezifischen, monoklonalen Antikörper CD41 (GP IIb/IIIa, Fibrinogenrezeptor) und CD42b (GP Ib-V-IX, von-Willebrand-Faktor Rezeptor) jeweils als Farbstoffkonjugate mit Phycoerythrin (PE, Emissionswellenlänge 568-590 nm) eingesetzt und dienten als Detektionsmarker zum Auffinden der Thrombozyten im Vollblut. Die Antikörper gegen die aktivierungsabhängigen Antigene P-Selektin (CD62P) und PAC-1 wurden jeweils als Farbstoffkonjugate mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Emissionswellenlänge 504-541 nm) verwendet. Zur Untersuchung der Thrombozytenreaktivität wurden Stimulationsversuche mit ADP und TRAP-6 in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Den Empfehlungen der Literatur (157, 170, 226, 279, 302) folgend wurden die Proben nach Abschluss der Antikörperinkubation fixiert (nachträgliche Fixierung). Um den Einfluss der Fixierung auf das Messergebnis zu untersuchen, erfolgten darüber hinaus auch Messungen ohne Fixierung (unfixiert) sowie von Proben, die zunächst fixiert und erst anschließend gefärbt wurden (direkte Fixierung). Während die Messung der nachträglich fixierten Proben in einem festen Ablauf über die gesamte Studie konstant durchgehalten wurde, konnten die Untersuchungen zum Einfluss der unterschiedlichen Fixierung aus Kapazitätsgründen nur an einzelnen Interventionstagen durchgeführt werden.

Mit der **Probenaufbereitung** für die Durchflusszytometrie wurde binnen 5 Minuten nach der Blutabnahme begonnen. Nach der Bestimmung der Thrombozytenzahl im Blutbildautomaten erfolgte zunächst eine Einstellung der Vollblutprobe auf eine konstante Zellzahl von 20000 Thrombozyten/ μ l. Dazu wurden jeweils 100 μ l des mit Na-Citrat antikoagulierten Vollbluts (2,9 ml Monovette) mit der entsprechenden Menge eines auf 37 °C vorgewärmten PBS-Puffers (pH 7,4; Life Technologies, Gibco-BRL, Karlsruhe - Germany) einschließlich 0,5 % bovinem Serumalbumin (BSA, Vitros Ortho-Clinical Diagnostics, Neckargemünd - Germany) verdünnt. Mit Ausnahme der direkten Fixierung (s.u.) gingen alle weiteren Ansätze von dieser Probenlösung aus. Um die artifizielle Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* möglichst gering zu halten, wurde keine der Proben während der Probenaufbereitung geschüttelt oder gevortext. Eine ausreichende Durchmischung wurde allein durch wiederholtes sanftes Aufziehen in eine 1 ml Pipettenspitze erreicht.

Thrombozytenaktivität (nachträgliche Fixierung): Zu 20 µl Probenlösung wurden zunächst 7,5 µl CD41-PE Antikörper (Klon P2, IgG1 mouse) und anschließend 4 µl CD62p-FITC Antikörper (Klon CLB-Thromb/6, IgG1 mouse) hinzugegeben. Für die zweite Färbung wurden weitere 20 µl Probenlösung mit je 7,5 µl CD42b-PE Antikörpern (Klon SZ2, IgG1 mouse; alle Coulter-Immunotech Diagnostics, Krefeld - Germany) und 10 µl PAC-1 - FITC Antikörpern (Klon SP-2/BALB/c; IgM mouse; Becton Dickinson, Heidelberg - Germany) versetzt. Für die Färbung wurden die Proben für jeweils 5 Minuten im Wärmebad bei 37 °C inkubiert. Die Antikörpermenge für eine ausreichend sättigende Konzentration war zuvor in Vorversuchen bestimmt worden. Abstoppen der Färbung und Fixierung der Zellen erfolgte dann mit 1 ml PBS-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA und 0,5 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA; Sigma, Deisenhofen - Germany) bei 4 °C.

Negativkontrollen zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz und der unspezifischen Färbung der Zellen wurden für beide Markierungsansätze in der Form durchgeführt, dass jeweils weitere 20 µl Probenlösung vor der eigentlichen Fluoreszenzfärbung mit je 4 µl bzw. 10 µl der identischen aber unkonjugierten CD62p bzw. PAC-1 Antikörper für 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert wurden. Erst dann folgte die Zugabe der fluoreszenzkonjugierten Antikörper wie oben beschrieben. Damit werden die spezifischen Bindungsstellen der Aktivierungsmarker CD62p und PAC-1 durch die unkonjugierten Antikörper blockiert und die farbstoffkonjugierten Antikörper können allenfalls noch unspezifisch binden (225, 297).

Thrombozytenreaktivität (nachträgliche Fixierung): Zur Stimulation der Thrombozyten *in vitro* wurden zunächst jeweils 16 µl der auf 20000 Plättchen/µl eingestellten Probenlösung mit jeweils 4 µl Stimulationslösung für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration der Stimulationslösung für TRAP-6 (SFLLRN; Bachem, Heidelberg - Germany) lag bei 50 µM. Dies entspricht einer Endkonzentration von 10 µM. Für die Stimulation mit ADP (Sigma) fanden jeweils Konzentrationen von 25 µM (CD41/CD62P) und 12,5 bzw. 50 µM (CD42b/PAC-1) Verwendung. Die entsprechenden Endkonzentrationen für die Stimulation lagen bei 5 µM bzw. 2,5 und 10 µM. Mit Ausnahme der höheren ADP-Stimulation lassen nach Arbeiten von KOKSCH (182) und eigenen Voruntersuchungen die gewählten Konzentrationen jeweils einen halbmaximalen Stimulationserfolg erwarten, welcher für das Aufdecken kleiner Reaktivitätsunterschiede besonders geeignet ist. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzfärbung nach der oben beschriebenen Methode. Erneut wurde die weitere Färbung durch Zugabe von 1 ml PBS-Puffer mit 0,5 % BSA und 0,5 % PFA bei 4 °C gestoppt.

Unfixierte / direkt fixierte Proben: Die Aufbereitung des unfixierten Ansatzes war mit dem oben beschriebenen Vorgehen für nachträglich fixierte Thrombozyten vollständig identisch.

Der einzige Unterschied bestand darin, dass zum Abstoppen der Immunfluoreszenzfärbung jeweils 1 ml PBS-Puffer mit 0,5 % BSA ohne Zugabe von Paraformaldehyd (PFA) verwendet wurde. Für die direkte Fixierung wurden je 500 µl Na-Citrat antikoagulierte Vollblut und 500 µl PBS-Puffer mit 0,5 % BSA und 1 % PFA gemischt und für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung entnommen und mit einer entsprechenden Menge an PBS-Puffer einschließlich 0,5 % BSA und 0,5 % PFA auf 20000 Thrombozyten/µl eingestellt. Die Weiterverarbeitung dieser fixierten Stammlösung folgte wiederum oben beschriebenen Vorgehen für nachträglich fixierte Proben. Die Parallelmessungen zur Untersuchung des Einflusses der Probenaufbereitung auf das Messergebnis wurden nur während des Laufband-Stufentestes durchgeführt.

Thrombozytenreaktivität (unfixiert): Das Vorgehen erfolgte identisch zu den Stimulationsversuche mit nachträglicher Fixierung. Als einziger Unterschied wurde die Immunfärbung mit 4 °C kaltem PBS-Puffer mit 0,5 % BSA ohne Zugabe von Paraformaldehyd gestoppt.

Wärmebad (10 min): Um Hinweise auf den Einfluss der Lagerung im Wärmebad während der Stimulation bzw. Inkubation auf die Thrombozytenaktivität zu erhalten, wurden 20 µl der unfixierten Ausgangslösung für 10 Minuten bei 37 °C gelagert und anschließend nach dem beschriebenen Vorgehen für nachträglich fixierte Proben aufbereitet. Aus Kapazitätsgründen wurden die beiden letztgenannten Ansätze nur während der Radergometrie durchgeführt.

Probenstabilität: Zur Untersuchung der Proben auf ihre zeitliche Stabilität wurden jeweils für 5 Probanden die Proben nach der eigentlichen Messung im Durchflusszytometer weiterhin bei 4° C und Dunkelheit gelagert und nach 15, 30 und 60 Minuten erneut gemessen.

Bis zur **durchflusszytometrischen Messung** wurden alle Proben nach dem Abstoppen der Stimulations- und/oder Markierungsreaktion für ca. 10 min dunkel und auf Eis gelagert. Vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zur abschließenden Messung vergingen für alle Proben maximal 45 Minuten. Alle Messungen erfolgten an einem EPICS® XL/MCL™ 4-Color Durchflusszytometer. Für die Datenaufnahme und Analyse wurde die System II™ Software (alles Beckman Coulter, Krefeld - Germany) verwendet. Gezählt wurden je 10000 Thrombozyten bei einer kontrollierten Flussrate von ca. 200 Ereignissen pro Sekunde.

Die Laseranregung erfolgte mit einem regulierten 15mW Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Messbereiche für die Immunfluoreszenzfarbstoffe lagen bei 525-550 nm für FITC und bei 575-600 nm für PE. Das Ausmaß der spektralen Überlappung der beiden Farbstoffe für die gewählten Verstärkereinstellungen war im Rahmen von Vorversuchen bestimmt worden. Während der Messungen erfolgte dann durch entsprechende Voreinstellung in der System II™ Software eine direkte Kompensation der spektralen Überlappung.

Zu Beginn jedes Untersuchungstages erfolgten standardisiert die Justierung der Einstellungen am Durchflusszytometer mit Hilfe von Flow-Set Fluorespheres[®] (Beckman Coulter) und der System IITM Software. Anhand von anschließenden Kontrollmessungen mit Flow-Check Fluorespheres[®] (Beckman Coulter) wurden die optischen Eigenschaften und Verstärkereinstellungen nochmals kontrolliert.

Die **Auswertung** mit der System IITM Software (Beckman Coulter) wird hier am Beispiel der Immunfluoreszenzmarkierung mit CD41/CD62P demonstriert. Die Identifizierung der Thrombozyten im Vollblut erfolgte anhand der zweidimensionalen Punktdarstellung in der Aufteilung nach Vorwärtstreulicht (Abszisse) und der Fluoreszenzintensität für den Phycoerythrin (PE) konjugierten monoklonalen CD41 Antikörper. Jeder der in Abbildung 9 wiedergegebenen Punkte entspricht einem durchflusszytometrischen Messereignis. Dabei sammeln sich die Messereignisse für gleiche Zellarten zu Wolken, deren Dichte die Häufigkeit der entsprechenden Zellpopulation wiedergibt. In der wiedergegebenen Graphik sind die Thrombozyten mit (a) gekennzeichnet. Die mit (b) beschriftete Zellwolke entsteht

durch den gemeinsamen Durchtritt von Erythrozyten und/oder Leukozyten mit Thrombozyten durch die Messkammer des Durchflusszytometers (211). Die Ereignisse besitzen zwar die gleiche CD41-PE Intensität, wie einzelne Thrombozyten, unterscheiden sich von diesen aber durch ein stärkeres FSC.

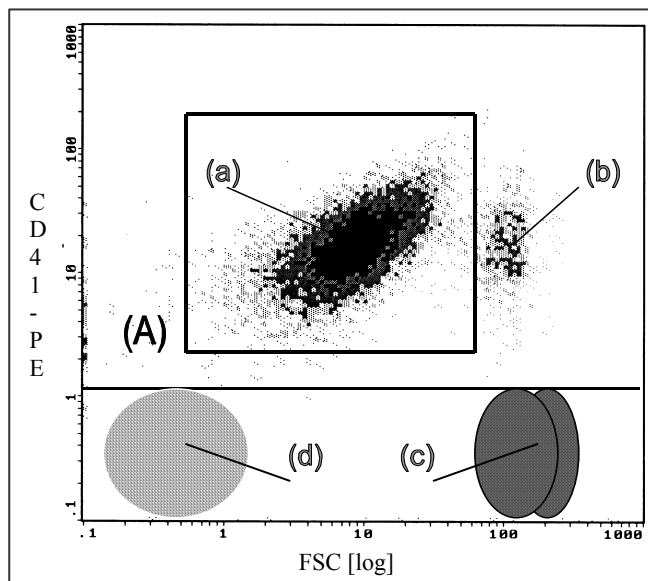
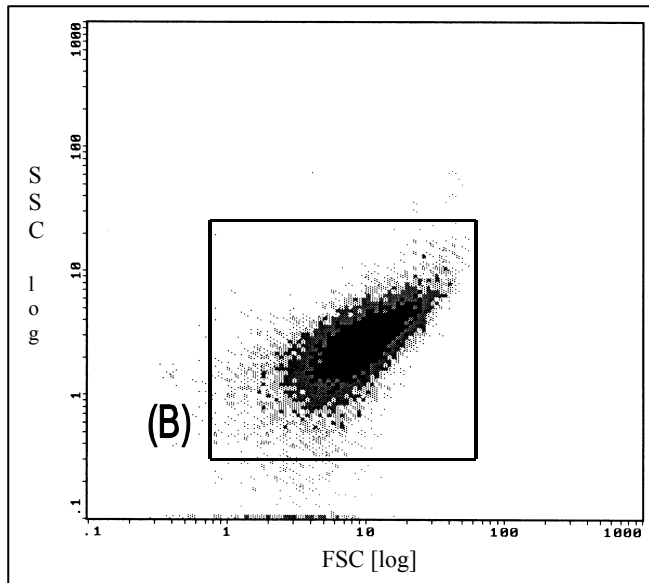


Abbildung 9: Detektion der Thrombozyten aus dem Vollblut. Gating nach FSC vs. CD41-PE (vgl. Text)

Mit Hilfe eines voreingestellten Schwellenwertes für die Fluoreszenzintensität von PE können alle Zellen, die nicht das plättchenspezifische CD41-Antigen tragen, ausgeschlossen werden. Zur Orientierung ist mit (c) die Lage der Erythrozyten und an ihrem rechten Rand auch der Leukozyten wiedergegeben. Die in jeder Messung zu beobachtenden Zelltrümmer und sonstigen Fragmente kämen entsprechend ihrer geringen Größe und Fluoreszenzintensität für CD41-PE im linken unteren Quadranten zum liegen (d). Für die weitere Analyse wurden die Thrombozyten in (A) markiert und ausgewählt („Gating“).

Die Validierung der in (A) gegateten Thrombozyten erfolgte dann in der Punktdarstellung von Vorwärts- gegen Seitwärtstreulicht (Abb. 10). Ereignisse, die in ihren FSC- und SSC-

Eigenschaften zu stark von der Kernpopulation abweichen, wurden ausgeschlossen und nur die in Gate (B) eingefassten Blutplättchen zur weiteren Analyse herangezogen (181, 183). Nach



Zählung von 10 000 Thrombozyten in Gate B wurde die Messung automatisch gestoppt. Für sie wurden mit Hilfe der System IITM Software die Mittelwerte des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes berechnet.

Abbildung 10: Validierung der Thrombozyten aus Gate A (Abb. 9) nach FSC vs. SSC

Abbildung 11 zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensität für den Phycoerythrin konjugierten CD41-Antikörper am Beispiel von ruhenden Thrombozyten (a) und nach Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 (b). Als Ausdruck der höheren Expression des CD41-Antigens auf der Plättchenoberfläche nach Stimulation ist die Verteilungskurve für die Fluoreszenzintensität von PE nach rechts verschoben. In beiden Fällen zeigt sich eine annähernde log-Normalverteilung einer einheitlichen Zellpopulation. Die Auswertung erfolgte hier durch die software-gestützte Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für CD41-PE der in Gate (C) gefassten Thrombozyten (183, 225, 268, 297).

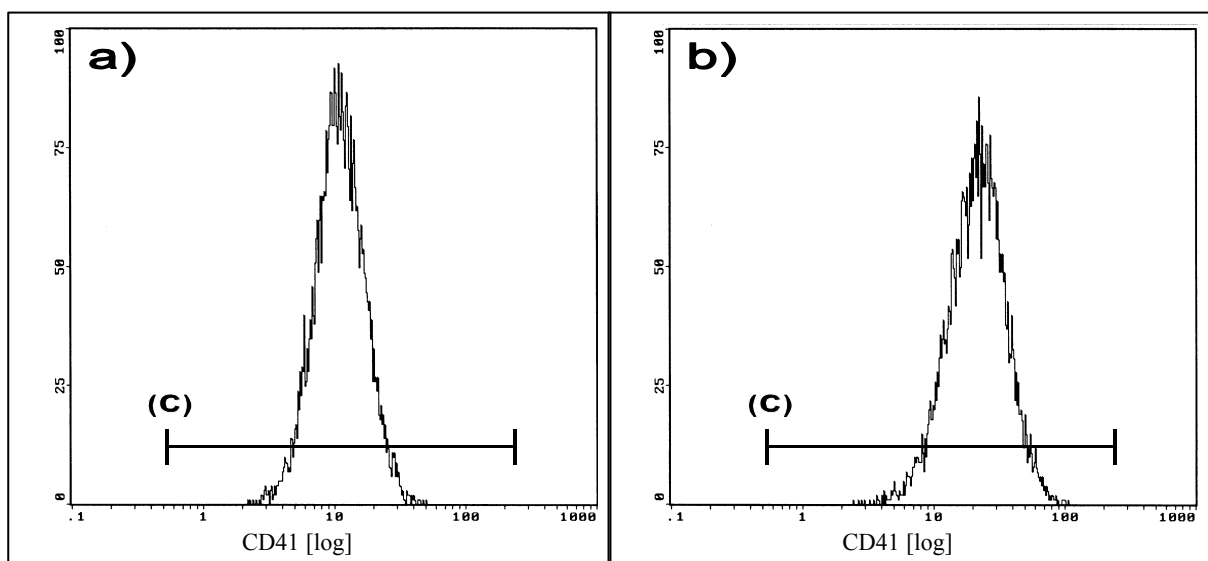


Abbildung 11: Auswertung mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD41-PE von ruhenden (a) und 10 μ M TRAP-6 stimulierten Thrombozyten (b)

Die Auswertung der Aktivität für CD62P-FITC kann prinzipiell ebenfalls durch die Berechnung der MFI für FITC erfolgen. Im Gegensatz zur CD41-PE Messung (s.o.) reagieren jedoch nicht alle Thrombozyten nach Stimulation einheitlich mit einer erhöhten Expression des CD62P-Antigens (Abb 12b). Hier bietet sich zusätzlich eine Auswertung nach *Prozent positiven Zellen* an (15, 268, 270, 297). Dazu wird in einer Negativkontrolle die Eigenfluoreszenz und die unspezifische Bindung von CD62P-Antikörpern an Thrombozyten bestimmt (Abb. 12a). Anhand dieser Kontrolle wird dann ein Schwellenwert als Cut-off Linie definiert, der etwa 0,5 bis 1% positive Zellen als Leerwert abgrenzt. Die Festlegung des Grenzwertes auf 0,5 bis 1 % folgt der allgemeinen Konvention und ergibt sich aus dem statistischen Verteilungsmuster und dem Auflösungsvermögen der Durchflusszytometrie. Alle Ereignisse, die sich während der Messung der spezifisch gefärbten Thrombozyten oberhalb des Grenzwertes verteilen, gelten als positive Zellen (Abb. 12b). Da CD62P nur auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten nachweisbar ist, entspricht die Auswertung nach Prozent positiven Zellen dem Anteil an aktivierten Thrombozyten in der untersuchten Probe. Die Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierung mit CD42b-PE und PAC-1-FITC erfolgte analog dem oben beschriebenen Vorgehen.

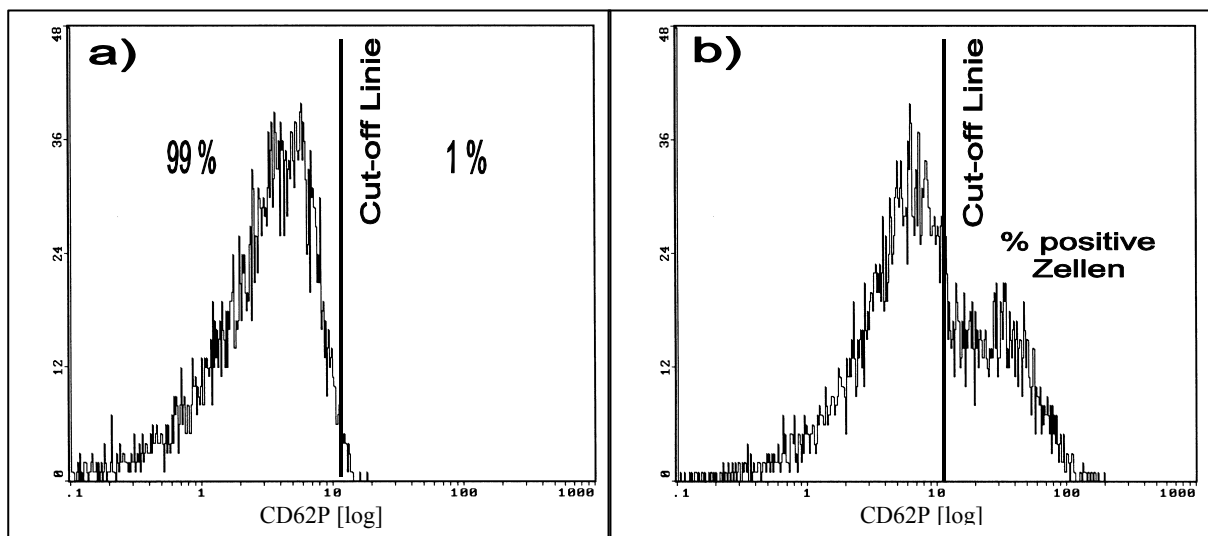


Abbildung 12: Auswertung nach % positiven Zellen für CD62P-FITC am Beispiel 10 μ M TRAP-6 stimulierter Thrombozyten (b) nach Festlegung eines Schwellenwerts in der Negativkontrolle (a)

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass in die Gate B gefassten und zur weiteren Auswertung herangezogenen Ereignisse eine Reinheit von > 98% Thrombozyten aufweisen. Zur Kontrolle der Reliabilität der Methode wurden vor Studienbeginn jeweils die Intra- und Intertest Variationskoeffizienten für die einzelnen Probenansätze bestimmt. Die Bestimmung der Intratestvariabilität erfolgte durch die 10-malige Messung der gleichen Probe. Für die Intertestvariabilität wurden jeweils 10 identische Proben pipettiert und anschließend

gemessen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Sie wurden im Sinne einer Fehlerabschätzung auf die nächst größere ganze Zahl gerundet. Für die Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften lagen sie in allen Ansätzen unter 3 %.

Tabelle 3: Intra- und Intertestvariabilität Durchflusszytometrie (MFI – mittlere Fluoreszenzintensität)

| | Intratestvariationskoeffizient | | | Intertestvariationskoeffizient | | |
|----------------------|---------------------------------------|----------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------|-------------------------|
| | CD41 [MFI] | CD62P [MFI] | CD62P [%pos. Zellen] | CD41 [MFI] | CD62P [MFI] | CD62P [%pos. Zellen] |
| unstim. nachtr. fix. | 1 % | 3 % | 7 % | 10 % | 10 % | 20 % |
| unstim. unfixiert | 1 % | 4 % | 10 % | 10 % | 7 % | 20 % |
| unstim. fixiert | 2 % | 4 % | 12 % | 12 % | 6 % | 20 % |
| 5 μ M ADP | 1 % | 3 % | 7 % | 5 % | 7 % | 15 % |
| 10 μ M TRAP-6 | 1 % | 3 % | 3 % | 5 % | 4% | 5% |
| | CD42b [MFI] | PAC-1 [MFI] | PAC-1 [%pos. Zellen] | CD42b [MFI] | PAC-1 [MFI] | PAC-1 [%pos. Zellen] |
| | | | | | | |
| unstim. nachtr. fix. | 1 % | 15 % | 25 % | 7 % | 7 % | 15 % |
| unstim. unfixiert | 1 % | 3 % | 12 % | 3 % | 4 % | 10 % |
| unstim. fixiert | 1 % | 3 % | 3 % | 10 % | 15% | 10 % |
| 2,5 μ M ADP | 1 % | 15 % | 15 % | 5 % | 7 % | 12 % |
| 10 μ M ADP | 1 % | 3 % | 3 % | 5 % | 7 % | 3 % |
| 10 μ M TRAP | 1 % | 10 % | 10 % | 5 % | 10 % | 12 % |

3.5.2 Teilstudie II – Thrombozyten-Leukozyten Konjugate

Aufbauend auf der vorausgegangenen Arbeit setzte diese zweite Teilstudie die Untersuchung der Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten in einer verkürzten Anordnung fort. Darüber hinaus lag der methodische Schwerpunkt auf dem Aufbau eines Protokolls zur erstmaligen Messung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten nach körperlicher Belastung.

Die Bestimmung der **Thrombozytenaktivität** wurde als Doppelfärbung mit CD41-PE und CD62P-FITC identisch zu der in Teilstudie 1 beschriebenen Methodik durchgeführt. Entsprechend der gewonnenen Ergebnissen wurde auf eine Fixierung der Proben vollständig verzichtet. Der einzige Unterschied bestand in einer veränderten Negativkontrolle. Anstelle der Vorinkubation der Probe mit einem unkonjugierten CD62P Antikörper erfolgte die Negativkontrolle mit Hilfe eines Isotyp-Antikörpers (IgG1 mouse - FITC, Klon 697.1Mc7, Coulter-Immunotech). Die Isotyp-Antikörper entstammen der gleichen Klasse von Immunglobulinen und besitzen mit Ausnahme der spezifischen Bindungsstelle (F_{ab} -Region) identischen Eigenschaften zu den eingesetzten Markierungsantikörpern. Sie sind im gleichen Protein-Farbstoffverhältnis konjugiert. Diese Form der Negativkontrolle hatte den Vorteil, dass die Vorinkubation der Proben entfiel und damit die Probenaufbereitung im Wärmebad

um weitere 5 Minuten verkürzt werden konnte. Für die Angabe des Anteils CD62P-positiver Zellen wurden die Leerwerte der Isotyp-Kontrolle subtrahiert.

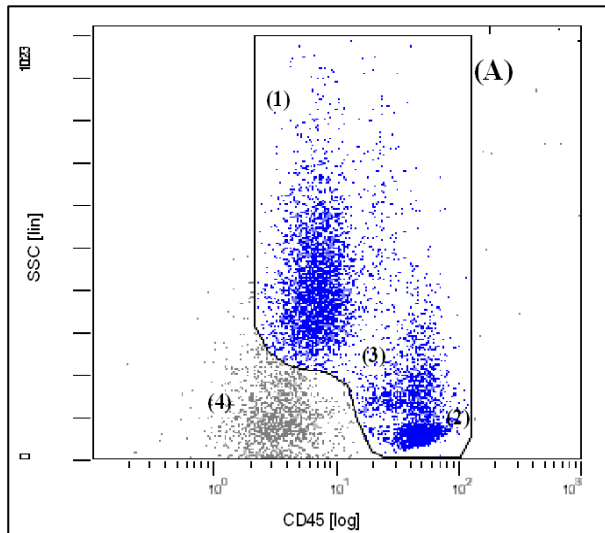
Die Untersuchung der **Reaktivität** erfolgte nach alleiniger Stimulation mit TRAP-6 ebenfalls in der Färbung mit CD41-PE und CD62P-FITC. Aufgrund des zum Teil sehr hohen Stimulationserfolges mit teilweise über 60 % aktivierten Thrombozyten, wie er bei einigen Probanden für eine Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 in der ersten Teilstudie beobachtet werden konnte, wurde die Stimulationsdosis auf eine Endkonzentration von 7,5 μ M reduziert. Die weitere Probenaufbereitung und Messung erfolgte identisch zu dem bereits beschriebenen Vorgehen und wurde ebenfalls unfixiert durchgeführt.

Die Probenaufbereitung zur Analyse von **Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten** wurde innerhalb von 5 Minuten nach der Blutabnahme begonnen. In einer Doppelfärbung nach der Methode der direkten Immunfluoreszenzmarkierung fand hier neben dem thrombozyten-spezifischen CD41 Antikörper mit dem monoklonalen CD45 Antikörper ein Pan-Leukozyten-Marker in einer Farbstoffkonjugation mit Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5, Wellenlänge 660-680 nm) Verwendung. Zunächst wurden jeweils 200 μ l des mit Na-Citrat antikoagulierten Vollbluts (2,9 ml Monovette) mit 600 μ l eines auf 37 °C vorgewärmten PBS-Puffers einschließlich 1 % BSA verdünnt. Jeweils 50 μ l dieser Probenlösung wurden mit 6 μ l CD45-PC5 Antikörper (Klon J33, IgG1 mouse; Coulter-Immunotech Diagnostics) und 12 μ l CD41-PE Antikörper für 10 Minuten im Wärmebad bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte das Abstoppen der Färbung durch Zugabe von 2 ml PBS-Puffer mit 1 % (w/v) BSA bei 4 °C. Bis zur Messung wurden die Proben dunkel und auf Eiswasser gelagert.

Für Negativkontrollen wurden bei sonst identischer Verarbeitung die monoklonalen CD41-PE Antikörper durch eine gleiche Menge von PE-konjugierten Isotyp-Antikörpern (IgG1 mouse, Klon 697.1Mc7, Coulter-Immunotech Diagnostics) ersetzt.

Alle **Messungen** erfolgten an einem EPICS® XL/MCL™ 4-Color Durchflusszytometer. Die Laseranregung erfolgte mit einem regulierten 15mW Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Messbereiche für die Immunfluoreszenzfarbstoffe lagen bei 525-550 nm für FITC, bei 575-600 nm für PE und bei 645-675 nm für PC-5. Gezählt wurden je 10000 Thrombozyten bzw. 5000 Leukozyten bei einer kontrollierten Flussrate von ca. 200 Ereignissen pro Sekunde. Für die Datenaufnahme und Analyse wurde die System II™ Software verwendet. Alle Messungen waren innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme abgeschlossen. Vor jedem Untersuchungstag erfolgte die automatisierte Justierung der Zytometereinstellungen mit Hilfe von Flow-Set Fluorespheres® und der System II™ Software sowie die anschließende Kontrollmessung mit Flow-Check Fluorespheres®.

Für die **Auswertung** der Leukozyten-Thrombozyten Konjugate demonstriert Abbildung 13 das Auffinden der Leukozyten (Gate A) im Vollblut auf der Grundlage ihrer Bindungsaffinität für den leukozyten-spezifischen CD45-PC5 Antikörper und ihres Seitwärtsstreulichts (SSC). Ein voreingestellter Schwellenwert erfasst nur solche Zellereignisse, deren Fluoreszenzaktivität für PC5 den Mindestwert 1 überschreitet. Durch unspezifische Färbung kommen dennoch einige Erythrozyten (4) zur Darstellung, die aufgrund ihres geringeren SSC von den Granulozyten (1) abgegrenzt werden können. Vorversuche mit einem unspezifischen Isotyp-



Antikörper für Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5) ergaben eine Reinheit in Gate (A) von > 96 % leukozyten-spezifischer Ereignisse. Nach Erfassung von 5000 Ereignissen in Gate (A) wurde die Datenaufnahme beendet und gespeichert.

Abbildung 13:
Detektion der Leukozyten aus dem Vollblut in der Darstellung CD45-PC5 vs. SSC (vgl. Text)
(1) Granulozyten; (2) Lymphozyten
(3) Monozyten; (4) Erythrozyten

Ausgehend von den in Gate (A) eingefassten Leukozyten erfolgte nun die Analyse der Konjugate auf der Grundlage ihrer zusätzlichen Färbung mit CD41-PE. Da das CD41-Antigen spezifischer Bestandteil der Thrombozytenmembran ist, gibt die Zahl der CD41-positiven Leukozyten den Anteil an Konjugaten wieder. Abbildung 14 zeigt die Festlegung eines Grenzwertes für die Auswertung nach CD41 positiven Ereignissen in [%] anhand der Isotyp-Kontrolle (links) und den Anteil an Konjugaten für die spezifische Färbung (rechts).

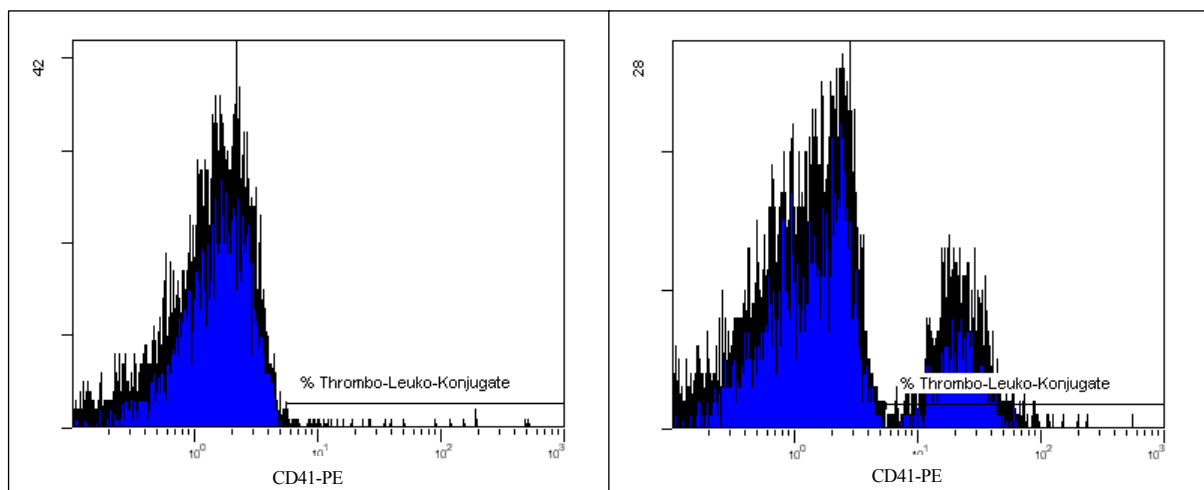


Abbildung 14: Auswertung Konjugate – Festlegung eines Schwellenwertes in der Isotyp-Kontrolle (links) und Auswertung nach % CD41 positiven Zellen (rechts)

Zur Kontrolle der Reliabilität wurden vor Studienbeginn die Intra- und Intertestvariabilität bestimmt. Bei 10-maligem Messen der gleichen Probe ergab sich für die Intratestvariabilität ein Wert von $< 3 \%$. Für die Intertestvariabilität wurden aus derselben Blutprobe jeweils 10 identische Proben pipettiert und anschließend gemessen. Hierbei konnte ein Variationskoeffizient von 11,7 % errechnet werden.

Im Rahmen der Methodikentwicklung wurden auch Messungen nach einer Erythrozytenlyse durchgeführt, wie sie zur Immunphänotypisierung von Leukozyten empfohlen wird (316) und auch in der Messung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten Verwendung gefunden hat (101, 102). Dazu wurden 50 μl des mit Na-Citrat antikoagulierten und mit PBS-Puffer einschließlich 1 % BSA auf 20000 Thrombozyten/ μl verdünnten Vollblutes mit jeweils 12 μl CD41-PE und 6 μl CD62P-FITC Antikörpern für 5 Minuten im Wärmebad bei 37 °C inkubiert. Der Immunfärbung folgte die vollautomatisierte Erythrozytenlyse an der TQ-Prep Workstation (Beckman Coulter) mit Hilfe des ImmunoPrep Reagent System (Coulter-Immunotech Diagnostics). Bis zur Messung innerhalb von 10 Minuten wurden die Proben bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert. Eine Negativkontrolle mit einem FITC-konjugierten Isotyp-Antikörper wurde ebenfalls durchgeführt.

3.5.3 Teilstudie III – Differenzierung von Konjugaten

Der methodische Schwerpunkt der Arbeit richtete sich auf einen weiteren Ausbau des Protokolls zur durchflusszytometrischen Messung der Konjugate mit dem Ziel einer immunologischen Differenzierung der Leukozytensubpopulationen. Ergänzend zur Analyse der Thrombozytenaktivität (CD41/CD62P) und Reaktivität (TRAP-6) wurde mit dem CD63 Antikörper ein alternativer Aktivierungsmarker in die Methodik eingeführt.

Die Untersuchung der **Thrombozytenaktivität** erfolgte identisch zu dem für Teilstudie II beschriebenen Vorgehen nach der Methode der direkten Immunfluoreszenzmarkierung in einer Doppelfärbung mit CD41-PE und CD62P-FITC. Ergänzend zur Untersuchung der Thrombozytenaktivität anhand der Expression von P-Selektin (CD62P) wurde mit dem Einsatz eines monoklonalen CD63 Antikörpers ein zusätzlicher Aktivierungsmarker (245) in die Analyse eingeführt. Die Probenaufbereitung erfolgte identisch zu der Doppelfärbung mit CD41-PE und CD62P-FITC. Der einzige Unterschied bestand darin, dass anstelle des CD62P Antikörpers nun 4 μl eines ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugierten CD63 Antikörpers (Klon CLBGran/12; IgG1 mouse; Coulter-Immunotech Diagnostics) zugegeben wurden. Vorversuche hatten ebenfalls eine ausreichend sättigende Konzentration des Antikörpers ergeben. Zur Bestimmung der **Reaktivität** wurde erneut eine in vitro Stimulation für 10 Minuten mit TRAP-6 in einer Endkonzentration von 7,5 μM durchgeführt.

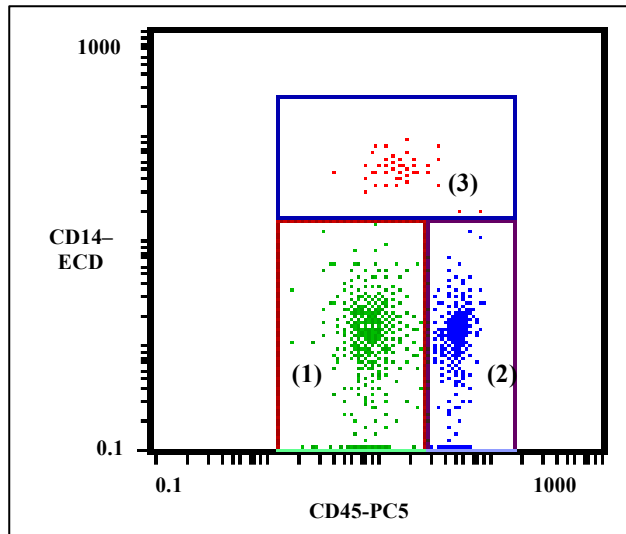
Die Probenaufbereitung zur differenzierten Messung von **Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten** wurde wiederum innerhalb von 5 Minuten nach Blutabnahme begonnen. Auch die Untersuchung der Konjugatbildung erfolgte in Analogie zu dem für den Dauertest beschriebenen Vorgehen durch direkte Immunfluoreszenzmarkierung mit CD41-PE und CD45-PC5. Zur weiteren immunologischen Differenzierung der Leukozyten wurde zusätzlich ein mit Phycoerythrin-Texas Red®-x (ECD, Wellenlänge 610-635 nm) konjugierter monoklonaler CD14 Antikörper (Klon RM052; IgG2a mouse, Coulter-Immunotech Diagnostics) eingeführt und so die Methodik auf eine 3-Farbenanalyse erweitert. Nach Herstellerangaben besitzt das CD14 Antigen eine sehr starke Expression auf Monozyten, ist auf Granulozyten sehr viel schwächer exprimiert und fehlt auf Zellen der lymphozytären Reihe. In Vorversuchen zeigte sich, dass mit einer Antikörpermenge von 6 µl eine ausreichend sättigende Konzentration erreicht wird. Nach Zugabe der Antikörper wurden die Proben für 10 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend die Färbung mit 2 ml PBS Puffer einschließlich 1 % (w/v) BSA bei 4 °C gestoppt. Alle Proben wurden bis zur Messung innerhalb von 5-10 Minuten im Dunkeln und auf Eiswasser gelagert und nicht fixiert.

Zur Untersuchung der Proben auf ihre zeitliche Stabilität wurden für 5 Probanden die Proben nach der eigentlichen Messung in das Eiswasser zurückgestellt und weiterhin bei Dunkelheit gelagert. Erneute Messungen erfolgte dann jeweils nach 15, 30 und 60 Minuten.

Alle **Messungen** wurden erneut an einem EPICS® XL/MCL™ 4-Color Durchflusszytometer durchgeführt. Die Messbereiche für die Immunfluoreszenzfarbstoffe lagen bei 525-550 nm für FITC, bei 575-600 nm für PE, bei 610-625 nm für ECD und bei 645-675 nm für PC-5. Automatische Stoppkriterien wurden bei 10000 Thrombozyten bzw. 1000 Monozyten mit einer kontrollierten Flussrate von ca. 200 Ereignissen pro Sekunde eingesetzt. Alle Messungen waren innerhalb von 30 Minuten nach Blutentnahme abgeschlossen. Zur Qualitätssicherung erfolgte die tägliche Kontrolle der Zytometereinstellungen und der Laserleistung mit Hilfe von Flow-Check Fluorespheres® und der System II™ Software.

Die **Auswertung** der Thrombozytenaktivität- und reaktivität für CD62P und CD63 wurde analog der bereits beschriebenen Methode nach % positive Zellen auf der Grundlage des in der Isotyp-Kontrolle festgelegten Grenzwertes durchgeführt. Für die Angabe des Anteils positiver Zellen wurden die Werte der Isotyp-Kontrolle wiederum als Leerwerte abgezogen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD41-PE diente als Maß für Veränderungen der Expression von CD41 auf der Thrombozytenoberfläche. Für die Auswertung der Thrombozyten-Leukozyten Konjugate erfolgte zunächst das Gating der Leukozyten aus dem Vollblut auf der Grundlage ihrer Färbung mit CD45-PC5 und ihrer Seitwärtsstreulicht-

eigenschaften (SSC) identisch zu dem bereits oben in Abbildung 13 dargestellten Vorgehen. Anschließend erfolgte die immunologische Differenzierung der Leukozyten mit Hilfe ihres



unterschiedlichen Färbeverhalten für CD45 und CD14 (vgl. Abb. 15). Hier gelingt eine exakte Unterscheidung von Granulozyten (1), Lymphozyten (2) und Monozyten (3) ohne eine Fixierung der Proben.

Abbildung 15:
Immunologische Differenzierung der Leukozyten nach CD45-PC5 vs. CD14-ECD; vgl. Text.

Nach dieser Differenzierung folgte die weitere Analyse der Konjugatbildung durch die Messung des für Thrombozyten spezifischen CD41 Antigens für jede der einzelnen Leukozytensubpopulationen getrennt. Nach dem bereits für Abbildung 14 beschriebenen Vorgehen entsprechen alle CD41 positiven Ereignisse, welche den mit Hilfe der Isotyp-Kontrolle gesetzten Schwellenwert überschreiten, dem Anteil an Konjugaten und können in Prozent angegeben werden. Zusätzlich liefert die Messung der MFI für CD41-PE einen Hinweis auf die Menge an gebundenem Antigen.

In Vorversuchen war die Reinheit der in Abb. 15 dargestellten Gates auf größer als 98 % spezifische Ereignisse bestimmt worden. Bei einer 3-Farbenanalyse gewinnt das Problem der spektralen Überlappung zwischen den verwendeten Farbstoffen eine zusätzliche Bedeutung. In Vorversuchen war daher das Ausmaß der spektralen Überlappung bestimmt und durch entsprechende Einstellungen der System IITM Software eine unmittelbare Kompensation vorgenommen worden.

Zur Kontrolle der Reliabilität wurden vor Studienbeginn jeweils Messungen zur Intra- und Intertestvariabilität durchgeführt. Die Bestimmung der Intratestvariabilität erfolgte durch 10-malige Messung der gleichen Probe. Für die Intertestvariabilität wurden aus derselben Blutprobe jeweils 10 identische Proben aufbereitet und gemessen. Für die immunologische Differenzierung der Leukozytensubpopulationen konnte jeweils eine Variabilität von < 3 % festgestellt werden. Bei der Konjugatbildung zeigte sich für alle Leukozytensubpopulationen in den Wiederholungsmessungen eine Variabilität von < 5 %. Die Intertestvariabilität für 10 parallel aufbereitete und gemessene Proben lag zwischen 11,3 % bei den Lymphozytenkonjugaten und 15,1 % in der Auswertung der Monozytenkonjugate.

3.6 Auswertung und Statistik

Eine akute körperliche Belastung führt zu einem Anstieg des arteriellen Mitteldrucks. Dies geht mit einer Erhöhung des hydrostatischen Perfusionsdrucks in den Kapillaren einher. Infolgedessen kommt es zu einem Austritt von Wasser und niedermolekularen Plasmabestandteilen aus dem Gefäß in das Interstitium (295). Für korpuskuläre und höhermolekulare Plasmabestandteile über 30000 Dalton stellt das Kapillarendothel eine Barriere dar, so dass es zu einer Konzentrationserhöhung der höhermolekularen Bestandteile im Plasma kommt. Diese Konzentrationszunahme wird durch weitere Wasserverluste (z. B. Schweiß) noch verstärkt.

Bei den untersuchten Belastungen ist davon auszugehen, dass es zu keiner nennenswerten Veränderung des Gesamtvolumens der Erythrozyten kommt. In Anlehnung an DILL und COSTILL (64) wurde deshalb auf der Basis der Hämatokrit-Messung folgende **Plasma-Volumen Korrektur** vorgenommen:

$$X_{kor} = X_{roh} \cdot \left(\frac{1 - Hct_b}{1 - Hct_a} \right)$$

| | |
|-----------|---------------------------------|
| X_{kor} | - korrigierter Wert |
| X_{roh} | - zu korrigierender Rohwert |
| Hct_a | - Hämatokrit der Bezugsprobe |
| Hct_b | - Hämatokrit der zu korr. Probe |

Eine solche Plasma-Volumen Korrektur erfolgte für die Messung der Thrombozytenzahl und der Plasmakonzentration für lösliches P-Selektin, welches eine Molekülgröße von 140000 Dalton besitzt. Als jeweilige Bezugsgröße diente die erste Ruheblutabnahme (A) der Probanden am jeweiligen Untersuchungstag.

Für alle gemessenen Parameter erfolgt zunächst die **deskriptive Statistik** mit Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung sowie Minimum und Maximum. Einzelmesswerte, die mehr als drei Standardabweichungen vom Mittelwert abweichen, wurden als Ausreißer bzw. Messfehler klassifiziert und aus der weiteren Auswertung herausgenommen.

Die graphische Ergebnisdarstellung erfolgt in Form von Box-Plots mit der Darstellung von Mittelwert \pm Standardabweichung sowie Minimum – Maximum für die jeweiligen Abnahmezeitpunkte. Die gewählte Form der Darstellung gibt den Einfluss der Belastungsintervention in ihrem zeitlichen Verlauf wieder und stellt die jeweiligen Ergebnisse der unterschiedlichen Fixierungsarten einander gegenüber.

Für die **schließende Statistik** wurden alle Werte zunächst auf Normalverteilung untersucht (Kolmogorov-Smirnov-Test). Da eine Normalverteilung nicht für alle Messwerte sicher bestätigt werden konnte, erfolgte die Prüfung auf signifikante Unterschiede über einen nicht-

parametrischen Rangsummentest (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben). Für die Irrtumswahrscheinlichkeit galt folgendes Signifikanzniveau:

| | | |
|----------------|--------------------|------|
| $p > 0,05$ | nicht signifikant | n.s. |
| $p \leq 0,05$ | signifikant | * |
| $p \leq 0,01$ | hoch signifikant | ** |
| $p \leq 0,001$ | höchst signifikant | *** |

Die Differenz der jeweiligen Messwerte zwischen den Messzeitpunkten unmittelbar vor sowie nach Belastung gibt den Einfluss der eigentlichen Belastungsintervention wieder. Um zu klären, ob die gefundenen Veränderungen tatsächlich auf die Belastung zurückzuführen sind, wurde neben der Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Meßzeitpunkten zusätzlich auch ein Vergleich mit dem entsprechenden Werteverlauf des Kontrollversuches durchgeführt. Dazu wurden für alle Untersuchungstage die Differenzen zwischen den Abnahmen vor und nach Belastung berechnet und einander gegenübergestellt. Aufgrund der erneut nicht sicher zu bestätigenden Normalverteilung dieser Differenzen (Kolmogorov-Smirnov-Test) erfolgte die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungstagen ebenfalls mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.

Zur Analyse der Probenstabilität wurden einige Proben unmittelbar nach ihrer Fertigstellung sowie jeweils nach 15, 30 und 60 Minuten gemessen. Die Untersuchung dieser Wiederholungsmessungen auf signifikante Unterschiede erfolgte anhand eines Rangvergleichs mit Hilfe von Friedmans ANOVA für wiederholte Messungen. Alle bisher genannten Analysen wurden mit Hilfe von STATISTICA/windows 5.1 software durchgeführt.

Zur weiteren Analyse der Vergleichbarkeit zwischen den Messergebnissen der unterschiedlichen Probenaufbereitungen wurde zusätzlich anhand der gepoolten Wertepaare der 4 Blutabnahmezeitpunkte eine Reliabilitätsanalyse durchgeführt. In einem gemischten 2-Wege Modell unter Definition einer absoluten Übereinstimmung wurde dazu mit Hilfe von SPSS 10.0 Software der Intraklassenkorrelationskoeffizient zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Fixierungsarten berechnet. Unter Berücksichtigung des oben genannten Signifikanzniveaus galt dabei folgende Einstufung für den Korrelationskoeffizienten R:

| | |
|--------------------|---------------------------|
| $R = 0$ | keine Übereinstimmung |
| $0 < R \leq 0,3$ | kaum Übereinstimmung |
| $0,3 < R \leq 0,6$ | geringe Übereinstimmung |
| $0,6 < R \leq 0,8$ | gute Übereinstimmung |
| $0,8 < R < 1,0$ | sehr gute Übereinstimmung |
| $R = 1,0$ | absolute Übereinstimmung |

4 Ergebnisse

4.1 Teilstudie I – Stufentestverfahren

Teilstudie I untersuchte die Wirkung einer klassischen Stufentestbelastung auf die Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten anhand von 4 verschiedenen Oberflächenantigenen (CD41, CD42b, CD62P und PAC-1). Der methodische Schwerpunkt richtete sich dabei insbesondere auf die Fragestellung, wie durch eine optimierte Probenaufbereitung eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten auf ein Minimum reduziert werden kann und welchen Einfluss eine Fixierung auf das Untersuchungsergebnis ausübt.

4.1.1 Ergometriedaten

Die ergometrischen Daten der Belastungsuntersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Für beide Belastungsarten zeigte sich ein hoch signifikanter Anstieg der Herzfrequenz und des Laktatspiegels gegenüber der Ruhemessung und dem Kontrolltag ($p \leq 0,01$). Die maximal erreichten Laktatwerte und die Herzfrequenzen verweisen auf eine weitgehende Ausbelastung der Probanden. Der Vergleich zwischen der maximalen Leistung und der Leistung an der IAS belegt, dass die Probanden jeweils noch etwa 2 Stufen oberhalb Ihrer IAS komplettierten. Dies entspricht einer anaeroben Belastungsdauer von ca. 6 Minuten. Die mittlere Dauer beider Testverfahren unterschied sich nicht voneinander und zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Dauer des Kontrollversuches von 20 Minuten, für den sich keine Veränderungen in der Herzfrequenz oder den Laktatwerten ergaben.

Tabelle 4: Ergometrieergebnisse Stufentest; Mittelwert \pm Standardabweichung;
 P_{\max} – maximale Leistung, P_{IAS} – Leistung an der IAS; ** - $p \leq 0,01$ vs. Ruhe u. Kontrolle;

| | Herzfrequenz [min^{-1}] | | Laktat [mmol/l] | | Zeit [min] | P_{\max} | P_{IAS} |
|------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | Ruhe | Max. | Ruhe | Max. | | [Watt bzw. m/s] | [Watt bzw. m/s] |
| Laufband | 68,7 $\pm 15,4$ | 192,5 ** $\pm 9,3$ | 1,1 $\pm 0,2$ | 10,8 ** $\pm 2,2$ | 19,9 $\pm 2,6$ | 4,8 $\pm 0,4$ | 3,7 $\pm 0,5$ |
| Rad | 67,0 $\pm 13,4$ | 186,4 ** $\pm 11,3$ | 1,3 $\pm 0,3$ | 12,5 ** $\pm 1,8$ | 19,4 $\pm 4,1$ | 324 ± 68 | 227 ± 59 |
| Kontrolle | 65,8 $\pm 12,4$ | 66,1 $\pm 10,9$ | 1,1 $\pm 0,5$ | 1,1 $\pm 0,3$ | 20 | - | - |

Bereits der Wechsel der Körperposition aus dem Liegen (A) in eine aufrechte Position (B) und eine mögliche psychische Anspannung vor Belastung führen zu einer kleinen aber signifikanten Zunahme der Katecholamine. Diese war auch im Kontrollversuch erkennbar. In deutlichem Unterschied zu dieser geringen Zunahme stieg die Konzentration der Katechol-

amine nach den Belastungsinterventionen auf ein Vielfaches der Ruhewerte (A) an. Die Zunahme der AdrenalinKonzentration um Faktor 6,5 für den Laufbandtest und um Faktor 7,7 während der Radergometrie verweist auf eine hohe Stressbelastung für den Organismus. Für die NoradrenalinKonzentration lagen die entsprechenden Faktoren sogar bei 21,0 (Laufband) und 18,9 (Rad). Die Zunahme nach Belastung unterschied sich jeweils hochsignifikant von den anderen Abnahmezeitpunkten und den Werten des Kontrollversuches ($p < 0,01$). Unterschiede zwischen der Laufband- und der Fahrradbelastung ergaben sich nicht. Das 20-minütige Sitzen auf dem Ergometer während des Kontrollversuches führte zu keiner weiteren Veränderung der Katecholamine. Eine Stunde nach Belastung hatten sich die Werte wieder weitgehend auf das Ruheniveau normalisiert.

Tabelle 5: Katecholamine Stufentest; Mittelwert \pm Standardabweichung;
A – 30 min Ruhe, B – vor Belastung, C – nach Belastung, D – 1 h nach Belastung;
* - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. A; §§ - $p \leq 0,01$ vs. A, B, D und Kontrolle

| Abnahme | A | B | C | D |
|-----------------------------|--------------|-----------------|-------------------|--------------|
| Adrenalin [pg/ml] | | | | |
| Laufband | 47 \pm 25 | 74 \pm 43* | 309 \pm 175§§ | 69 \pm 45* |
| Rad | 47 \pm 37 | 68 \pm 43** | 361 \pm 257§§ | 37 \pm 19 |
| Kontrolle | 36 \pm 17 | 43 \pm 30 | 49 \pm 27* | 31 \pm 19 |
| Noradrenalin [pg/ml] | | | | |
| Laufband | 147 \pm 79 | 250 \pm 98** | 3083 \pm 1074§§ | 174 \pm 59 |
| Rad | 161 \pm 68 | 311 \pm 112** | 3047 \pm 1386§§ | 179 \pm 83 |
| Kontrolle | 164 \pm 72 | 284 \pm 102** | 274 \pm 74** | 186 \pm 62 |

4.1.2 Thrombozytenzahl und -größe

Zu Belastungsende stieg die Thrombozytenzahl nach dem Laufbandtest um durchschnittlich 28,6 % und nach den Radergometertest um 29,8 % (jeweils $p \leq 0,01$) an. Unterschiede zwischen Laufband und Radtest ergaben sich nicht. Tabelle 6 macht deutlich, dass bereits der Lagewechsel aus dem Liegen (A) in die sitzende Position auf dem Radergometer (B) zu einem moderaten aber signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl führte. Diese Zunahme unterscheidet sich hochsignifikant von der Zunahme unter Belastung ($p \leq 0,01$). Nach einer Stunde Ruhe im Liegen kehrte die Thrombozytenzahl wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Ferner zeigte sich nach Belastung auch eine moderate Zunahme des mittleren Thrombozytenvolumens (mean platelet volume, MPV), welches sich signifikant von den anderen Abnahmezeitpunkten und den Werten des Kontrollversuches unterscheidet.

Tabelle 6: Thrombozytenzahl und mittleres Thrombozytenvolumen Stufentest; Mittelwert \pm Standardabw. ;
A – 30 min Ruhe, B – vor Belastung, C – nach Belastung, D – 1 h nach Belastung;
* - $p \leq 0,05$ vs. A u. D; § - $p \leq 0,05$ u. §§ - $p \leq 0,01$ vs. A, B, D und Kontrolle;

| Abnahme | A | B | C | D |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Thrombozytenzahl [Gpt/l] | | | | |
| Laufband | 191 \pm 42 | 198 \pm 44 | 243 \pm 47 §§ | 196 \pm 47 |
| Radergometer | 190 \pm 42 | 205 \pm 49 * | 245 \pm 51 §§ | 201 \pm 47 |
| Kontrolle | 197 \pm 47 | 211 \pm 50 * | 207 \pm 47 * | 196 \pm 43 |
| mittleres Thrombozytenvolumen [fl] | | | | |
| Laufband | 6,37 \pm 0,86 | 6,40 \pm 0,78 | 6,72 \pm 0,72 § | 6,36 \pm 0,92 |
| Radergometer | 6,30 \pm 0,70 | 6,46 \pm 0,88 | 6,74 \pm 0,74 § | 6,52 \pm 0,86 |
| Kontrolle | 6,41 \pm 0,80 | 6,52 \pm 0,82 | 6,45 \pm 0,90 | 6,46 \pm 0,80 |

4.1.3 Thrombozytenaktivität und -reaktivität

Entsprechend der Fragestellung konzentriert sich die Darstellung der Ergebnisse auf die labormethodischen Aspekte der Arbeit. Die Ergebnisse zur Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten nach dem Laufbandstufentest im Vergleich zum Kontrollversuch wurden bereits an anderer Stelle wiedergegeben und können dort eingesehen werden (136).

Um den Einfluß der Methodik auf das Meßergebnis zu untersuchen, erfolgte die durchflußzytometrische Untersuchung der Thrombozytenaktivität für den Stufentest auf dem Laufband jeweils in Parallelmessungen von fixierten und unfixierten Proben. Die Fixierung mit 0,5 % Paraformaldehyd wurde entweder nach der Immunfluoreszenzfärbung (nachträglich) oder vor der Färbung (direkt) vorgenommen.

Tabelle 7 faßt die Streulichteigenschaften der Thrombozyten für die verschiedenen Fixierungen zusammen. Abhängig vom Zeitpunkt der Fixierung kam es zu einem Rückgang des Vor-

Tabelle 7: Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC); Mittelwert \pm Standardabw.; unfixiert sowie Fixierung mit 0,5 % PFA vor (direkt) und nach Immunfluoreszenzfärbung (nachträglich);
A – 30 min Ruhe, B – vor Belastung, C – nach Belastung, D – 1 h nach Belastung
** - $p \leq 0,01$ vs. A u. D; §§ - $p \leq 0,01$ vs. A, B und D; ## - $p \leq 0,01$ vs. unfixiert und jeweils untereinander

| Abnahme | A | B | C | D |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Vorwärtsstreulicht [dimensionslos] | | | | |
| unfixiert | 8,82 \pm 1,46 | 9,08 \pm 1,47 | 9,18 \pm 1,55** | 8,77 \pm 1,44 |
| nachträglich ## | 6,58 \pm 1,03 | 6,65 \pm 1,03 | 6,98 \pm 1,19§§ | 6,50 \pm 1,11 |
| direkt ## | 5,04 \pm 0,97 | 5,16 \pm 0,94 | 5,29 \pm 0,86 | 4,98 \pm 0,87 |
| Seitwärtsstreulicht [dimensionslos] | | | | |
| unfixiert | 2,29 \pm 0,24 | 2,28 \pm 0,22 | 2,26 \pm 0,23 | 2,25 \pm 0,20 |
| nachträglich ## | 2,47 \pm 0,27 | 2,39 \pm 0,24 | 2,38 \pm 0,27 | 2,37 \pm 0,26 |
| direkt ## | 2,65 \pm 0,43 | 2,68 \pm 0,28 | 2,70 \pm 0,31 | 2,67 \pm 0,30 |

wärtsstreulichts (FSC) bei gleichzeitiger Zunahme des Seitwärtsstreulichts (SSC). Die drei Ansätze unterschieden sich jeweils hochsignifikant voneinander. Entsprechend der oben beschriebenen Zunahme des MPV nach Belastung fand sich auch ein Anstieg des FSC, dem durchflusszytometrischen Maß der Zellgröße. Dieser Anstieg nach Belastung unterschied sich in den unfixierten und nachträglich fixierten Proben jeweils hoch signifikant von den anderen Abnahmezeitpunkten, nicht aber nach direkter Fixierung. Für alle untersuchten Proben blieb die Stufentestbelastung ohne meßbaren Einfluß auf das SSC.

In Folge der nachträglichen Fixierung ergab sich eine moderate Zunahme der mittleren Fluoreszenzaktivität für den thrombozytenspezifischen CD41 Antikörper gegenüber der unfixierten Verarbeitung (vgl. Abb. 16). Mit Ausnahme von Abnahme C unterschieden sich die anderen Abnahmezeitpunkte jeweils signifikant voneinander ($p \leq 0,05$). Dennoch ergab ein Intraklassenkorrelationskoeffizient von $R=0,79$ ($p \leq 0,001$) eine vergleichsweise gute Übereinstimmung beider Methoden. In deutlichem Gegensatz zu dieser eher moderaten Veränderung bewirkte die direkte Fixierung vor der Immunfärbung nahezu eine Verdoppelung der Oberflächenexpression von CD41 ($p < 0,01$). Die niedrigen Korrelationskoeffizienten von $R=0,08$ ($p \leq 0,001$; unfixiert) und $R=0,09$ ($p \leq 0,001$; nachträglich) unterstreichen die kaum vorhandene Übereinstimmung der Meßwerte.

Eine Zunahme der MFI für CD41-PE durch die Belastungsintervention findet sich nur für die direkte Fixierung ($p \leq 0,05$), nicht aber bei unfixierter oder nachträglich fixierter Verarbeitung.

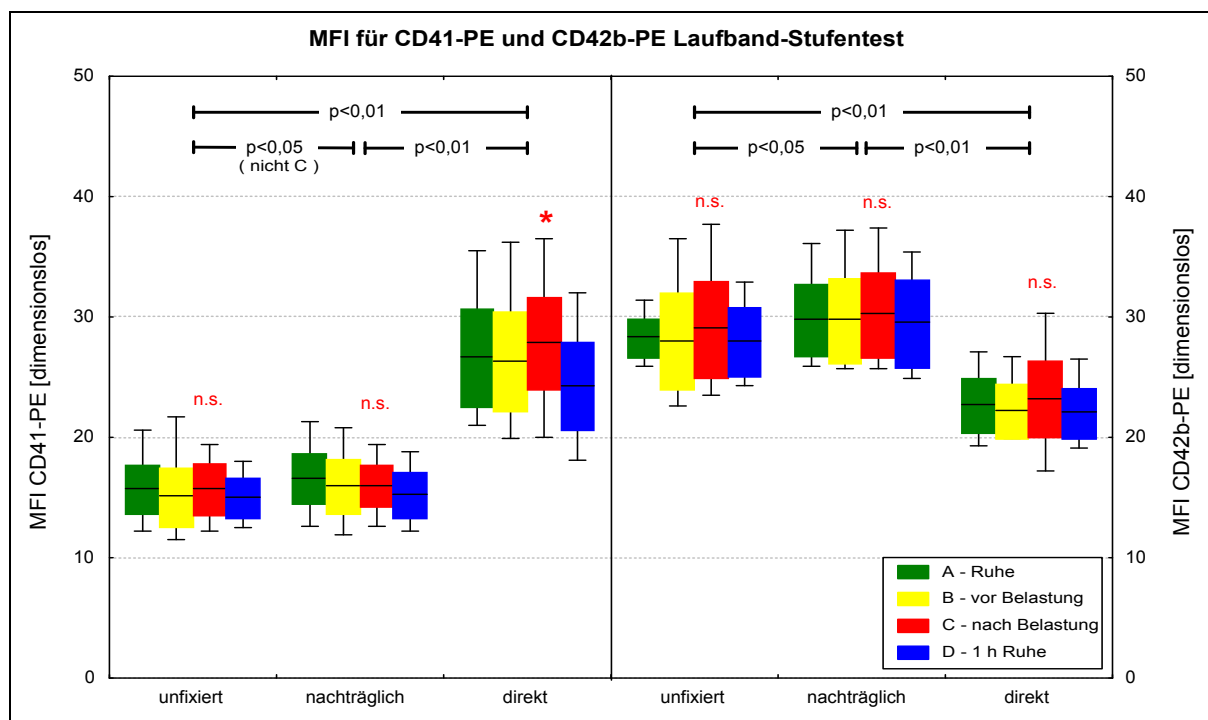


Abbildung 16: mittlere Fluoreszenzintensität für CD41-PE und CD42b-PE ruhender Thrombozyten; unfixiert sowie Fixierung mit 0,5 % PFA vor (direkt) und nach Immunfluoreszenzfärbung (nachträglich); Mittelwert \pm Standardabw., Minimum-Maximum; * - $p < 0,05$ vs. A, B u. D; n.s. - nicht signifikant

Auch in der Immunfluoreszenzmarkierung mit CD42b-PE zeigte sich durch die nachträgliche Fixierung ein leichter Anstieg der MFI gegenüber den unfixierten Thrombozyten, der für alle 4 Abnahmezeitpunkte mit $p \leq 0,05$ jeweils signifikant war. Demgegenüber führte die direkte Fixierung zu einem hochsignifikanten Abfall der MFI für CD42-PE. Erneut fand sich mit einer Intraklassenkorrelation von $R=0,80$ ($p \leq 0,001$) eine gute Vergleichbarkeit zwischen den Messergebnissen der unfixierten und der nachträglich fixierten Probe. Gegenüber der direkten Fixierung war mit $R=0,22$ (unfixiert) und $R=0,19$ (nachträglich; jeweils $p \leq 0,001$) kaum eine Vergleichbarkeit gegeben. Ein sicherer Einfluß der Stufentestbelastung auf die Oberflächenexpression von CD42b ergab sich in keinem der untersuchten Ansätze.

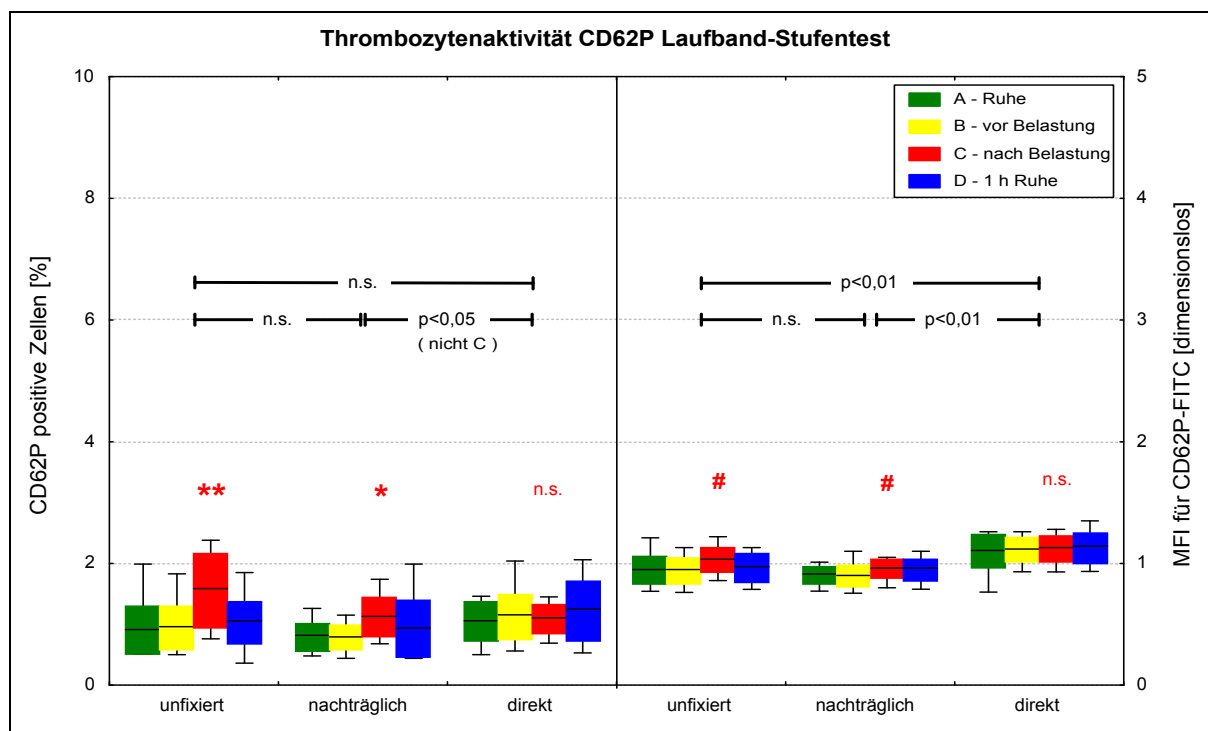


Abbildung 17: Thrombozytenaktivität CD62P ruhender Thrombozyten; unfixiert sowie Fixierung mit 0,5 % PFA vor (direkt) und nach Immunfluoreszenzfärbung (nachträglich); Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum-Maximum; n.s. - nicht signifikant; * - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. A, B u. D; # $p \leq 0,05$ vs. A u. B

Abbildung 17 gibt die Meßergebnisse für die Expression des aktivierungsabhängigen CD62P Antikörpers der ruhenden Thrombozyten sowohl in der Auswertung nach % positiven Zellen als auch für die MFI wieder. Zwischen beiden Auswertungen bestehen diskrete Unterschiede, die sich in der gemeinsamen Betrachtung zu einem einheitlichen Gesamtbild ergänzen.

In Ruhe fand sich mit $0,9 \pm 0,4$ % positiven Zellen ohne Fixierung und mit $0,8 \pm 0,2$ % bei nachträglicher Fixierung jeweils ein sehr geringes Aktivierungsniveau, welches sich auch nicht von den Werten der Negativkontrolle mit $0,7 \pm 0,2$ % positiven Zellen unterschied (siehe Anhang). Zwischen beiden Ansätzen ergaben sich sowohl in der Auswertung der MFI als auch nach % positiven Zellen keine signifikanten Lageunterschiede. Im Gegensatz dazu

führte die direkte Fixierung in der Auswertung der MFI für CD62P-FITC zu einer hoch signifikanten Aktivitätszunahme gegenüber den anderen Ansätzen ($p \leq 0,01$). Auch in der Auswertung nach % positiven Zellen fand sich schon in Ruhe eine Zunahme auf $1,1 \pm 0,3$ % aktivierte Thrombozyten, die sich signifikant von der Negativkontrolle und den nachträglich fixierten Proben unterschied. Aufgrund des sehr kleinen Wertebereichs bis maximal ca. 2,4 % aktivierte Zellen erreichte der Intraklassenkorrelationskoeffizient zwischen der unfixierten und der nachträglich fixierten Verarbeitung nur einen geringen Wert von $R=0,48$ ($p \leq 0,001$). Erneut lagen die Vergleichswerte gegenüber der direkten Fixierung mit $R=0,14$ (unfixiert) bzw. $R=0,28$ (nachträglich fixiert; jeweils $p \leq 0,001$) auf deutlich schlechterem Niveau.

In der unfixierten Verarbeitung stieg der Anteil von $0,9 \pm 0,4$ % aktivierten Thrombozyten unmittelbar vor Belastung auf $1,6 \pm 0,6$ % nach dem Laufbandstufentest an ($p \leq 0,01$). Auch bei nachträglicher Fixierung zeigte sich ein vergleichbarer Anstieg von $0,8 \pm 0,2$ % vor auf $1,1 \pm 0,3$ % nach Belastung. Dieser Anstieg unterschied sich jeweils signifikant von den anderen Abnahmezeitpunkten sowie dem Kontrollversuch ($p \leq 0,05$). Alle Veränderungen waren 1 Stunde nach Belastungsende vollständig reversibel. Angesichts des schon in Ruhe erhöhten Aktivierungsniveaus konnte für die direkte Fixierung kein Einfluss der Belastungsintervention auf die Thrombozytenaktivität gefunden werden.

Für die Immunfluoreszenzmarkierung mit PAC-1, dem zweiten aktivierungsabhängigen Antikörper, traten die Fixierungsunterschiede noch deutlicher in Erscheinung. Bereits in Ruhe war bei nachträglicher Fixierung der Anteil an PAC-1 positiven Zellen mit $3,2 \pm 2,3$ % hochsignifikant gegenüber der unfixierten Messung mit durchschnittlich $1,8 \pm 1,2$ % aktivierten Zellen erhöht ($p \leq 0,01$). Der entsprechende Intraklassenkorrelationskoeffizient für die Auswertung nach % positiven Zellen zwischen beiden Ansätzen lag bei $R=0,42$ ($p \leq 0,001$) und verwies auf eine allenfalls geringe Vergleichbarkeit. Gegenüber der direkten Fixierung war mit $R=0,01$ (un- und nachträglich fixiert; jeweils $p \leq 0,001$) die Vergleichbarkeit vollständig aufgehoben. Die Ursache dafür lag in einer fulminanten Änderung der Bindungsfähigkeit für PAC-1 mit einem Anstieg auf über 70 % positive Zellen nach der direkten Fixierung. Aufgrund dieser Zunahme wurde die Wirkung der Belastungsintervention vollständig durch die Einflüsse der direkten Fixierung überlagert. Hingegen fand sich in der unfixierten Verarbeitung ein mittlerer Anstieg des Anteils PAC-1 positiver Zellen von $1,8 \pm 1,0$ % vor auf $2,2 \pm 1,0$ % nach Belastung ($p \leq 0,05$). Dieser geringe Anstieg konnte durch die weniger sensitive Auswertung der MFI nicht erfaßt werden. Ähnlich einer moderaten Stimulation ergab sich für die nachträgliche Fixierung eine Verstärkung der Aktivitätszunahme von $3,3 \pm 2,2$ % vor auf durchschnittlich $5,1 \pm 2,9$ % aktivierte Thrombozyten nach Belastung. Diese

Zunahme wurde sowohl in der Auswertung der MFI als auch nach % positiven Zellen erfaßt und unterschied sich auch signifikant vom Werteverlauf im Kontrollversuch ($p \leq 0,05$). Alle Veränderungen waren wiederum 1 Stunde nach Belastungsende vollständig reversibel.

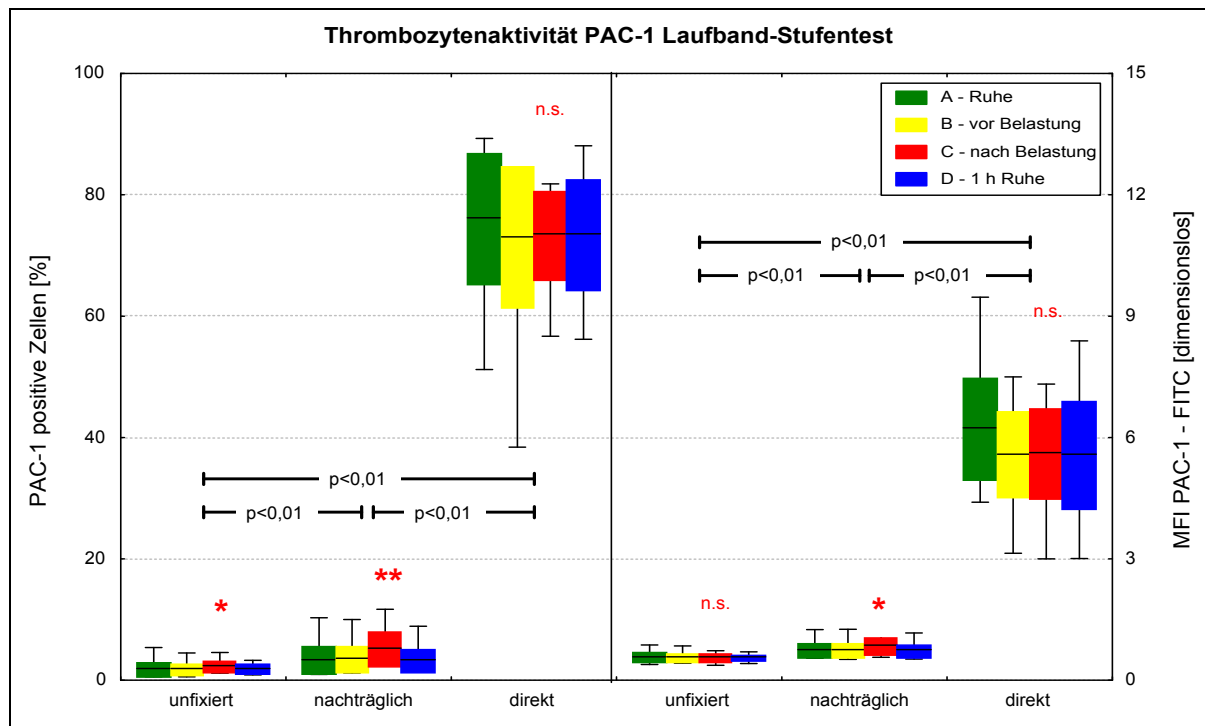


Abbildung 18: Thrombozytenaktivität PAC-1 ruhender Thrombozyten; unfixiert sowie Fixierung mit 0,5 % PFA vor (direkt) und nach Immunfluoreszenzfärbung (nachträglich); Mittelwert \pm Standardabw., Minimum-Maximum; n.s. - nicht signifikant; * - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. A, B u. D

Aus einer Inkubationszeit von 5 Minuten für den unkonjugierten Antikörper der Negativkontrollen und die anschließende eigentliche Immunfluoreszenzmarkierung für weitere 5 Minuten ergab sich eine Aufbereitungsdauer von 10 Minuten für die Untersuchung der Thrombozytenaktivität. Um den Einfluß der Aufbereitungsdauer auf eine Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* zu untersuchen, wurden während der Fahrradergometrie zusätzlich auch Proben zunächst für 10 Minuten im Wärmebad belassen und erst anschließend gefärbt.

Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, führte die zusätzliche Lagerung der Thrombozyten für 10 Minuten im Wärmebad zu keiner signifikanten Veränderung der CD62P Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Mit im Mittel etwa 1 % CD62P positiven Zellen blieb die Aktivität der Thrombozyten auf dem bekannt niedrigen Niveau. Ähnlich des Laufbandtests zeigte sich auch für die Fahrradergometrie nur eine geringe Zunahme der Thrombozytenaktivität von durchschnittlich $0,9 \pm 0,3$ % vor auf $1,2 \pm 0,8$ % nach Belastung (sofortige Aufbereitung) bzw. von $1,0 \pm 0,4$ % auf $1,2 \pm 0,5$ % (Wärmebad). Diese Zunahme verfehlte bei sofortiger Probenaufbereitung mit $p=0,07$ das gesetzte Signifikanzniveau jedoch knapp und nur nach der verzögerten Aufbereitung konnte ein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p \leq 0,05$).

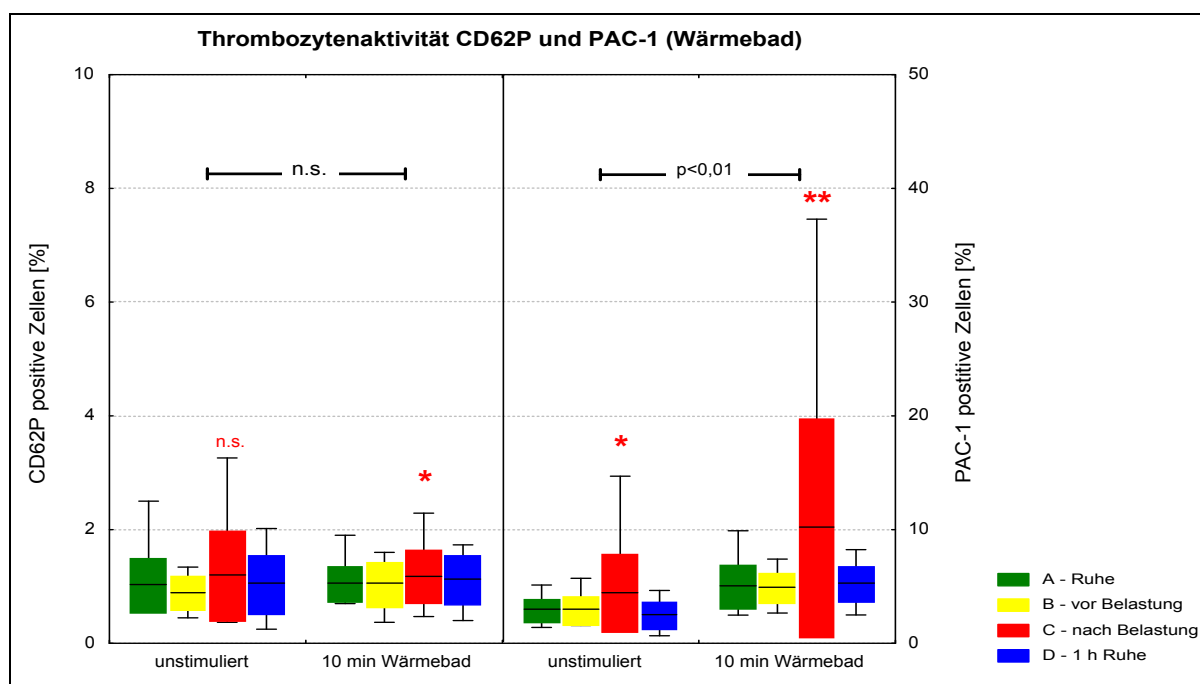


Abbildung 19: Thrombozytenaktivität CD62P und PAC-1 für ruhende Thrombozyten und nach 10 Minuten Wärmebad bei 37 °C während der Fahrradergometrie, jeweils nachträglich fixiert; Mittelwert \pm Standardabw.; Minimum-Maximum; n.s. - nicht signifikant; * - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. A, B u. D

Im Gegensatz dazu führte die Lagerung im Wärmebad zu einem hochsignifikanten Anstieg des Anteils an PAC-1 positiven Zellen ($p \leq 0,01$) und darüber hinaus zu einer deutlichen Verstärkung des aktivierenden Einfluß der Belastungsintervention. So stieg der Anteil an aktivierten Thrombozyten in der herkömmlichen Aufbereitung von durchschnittlich $2,9 \pm 1,3$ unmittelbar vor der Fahrradergometrie auf $4,8 \pm 1,3$ % nach Belastung an ($p \leq 0,05$). Für die zusätzliche Lagerung von 10 Minuten ergab sich ein Anstieg von $4,4 \pm 3,4$ % vor Testbeginn bis auf $10,2 \pm 9,6$ % nach Belastungsende ($p \leq 0,01$).

Hinsichtlich der Fragestellung, ob eine Zunahme der Thrombozytenaktivität nach Belastung bereits *in vivo* erfolgt oder erst in Folge der Probenaufbereitung auftritt, erfolgte neben dem durchflusszytometrischen Nachweis von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche zusätzlich die Messung von löslichem P-Selektin im Blutplasma als einen indirekten Marker der Thrombozytenaktivierung *in vivo*. Dabei zeigte sich eine signifikante Zunahme von löslichem P-Selektin unmittelbar nach Belastung, die auch eine Stunde nach Belastung noch nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt war ($p \leq 0,05$).

Tabelle 8: lösliches P-Selektin [mg/l]; Mittelwert \pm Standardabweichung;
* - $p \leq 0,05$ jeweils vs. Kontrolle und den anderen Abnahmezeitpunkten

| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Laufband-Stufentest | $38,9 \pm 14,4$ | $38,2 \pm 10,6$ | $46,3 \pm 14,9$ * | $43,7 \pm 15,9$ * |
| Kontrollversuch | $37,4 \pm 17,0$ | $39,2 \pm 17,2$ | $41,4 \pm 17,5$ ^{ns} | $37,4 \pm 16,1$ ^{ns} |

Zur Untersuchung der Reaktivität von Thrombozyten vor und nach Belastung erfolgten Stimulationsversuche mit ADP und TRAP-6. Tabelle 9 faßt die Ergebnisse der verschiedenen Stimulationen für den Laufbandtest zusammen. Dabei zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen der beiden Aktivierungsmarker CD62P und PAC-1 auf die Stimulation. Während ADP durch eine Aktivierung des GP IIb-IIIa Rezeptors überwiegend die Bindungskapazität für PAC-1 erhöhte und nur einen geringen Stimulationseffekt für die Expression von CD62P zeigte, führte die Stimulation mit TRAP-6 vor allem zu einer Sekretion aus den Granula mit der Folge einer deutlichen Steigerung der Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P).

Tabelle 9: Thrombozytenreaktivität Laufband-Stufentest; Mittelwert \pm Standardabweichung;
* - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ jeweils vs. Kontrolle und den anderen Abnahmezeitpunkten

| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | CD62P [% positive Zellen] | | | |
| 5 μM ADP | 4,4 \pm 3,7 | 4,3 \pm 3,1 | 7,2 \pm 6,6** | 4,2 \pm 3,7 |
| 10 μM TRAP-6 | 35,5 \pm 14,4 | 36,1 \pm 14,0 | 41,2 \pm 14,2* | 32,2 \pm 11,8 |
| | PAC-1 [% positive Zellen] | | | |
| 2,5 μM ADP | 46,7 \pm 14,5 | 45,5 \pm 11,2 | 58,0 \pm 21,8* | 38,4 \pm 15,9 |
| 10 μM ADP | 68,8 \pm 16,2 | 69,7 \pm 13,4 | 73,3 \pm 11,2 | 71,7 \pm 14,2 |
| 10 μM TRAP-6 | 18,9 \pm 10,4 | 16,6 \pm 9,9 | 21,8 \pm 12,2* | 16,6 \pm 9,8 |

Für alle Stimulationsversuche mit einer moderaten Stimulationswirkung ergab sich eine klare Zunahme der Reaktivität der Thrombozyten als Reaktion auf den Laufbandstufentest. Diese Zunahme unterschied sich jeweils signifikant von den anderen Abnahmezeitpunkten sowie den Werten des Kontrollversuchs und war eine Stunde nach Belastungsende vollständig rückläufig. Demgegenüber war nach einer Stimulation mit 10 μ M ADP und einem Anteil von ca. 70 % PAC-1 positiven Zellen die Stimulationswirkung so hoch, dass der Einfluß der Belastungsintervention durch die Intensität der Stimulation vollständig überlagert wurde.

Um den Einfluss der Fixierung auf das Messergebnis nach erfolgter *in vitro* Stimulation zu untersuchen, wurde während der Fahrradbelastung neben der nachträglichen Fixierung auch eine Messung von unfixierten Proben nach Stimulation durchgeführt.

Nach Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 zeigte sich für die MFI von CD41-PE bei nachträglicher Fixierung eine leichte Zunahme gegenüber den unfixierten Proben, die mit Ausnahme von C mit $p < 0,05$ jeweils signifikant war. In beiden Ansätzen ließ sich eine signifikante Zunahme der CD41 Oberflächenexpression in Folge der Stufentestbelastung auf dem Radergometer beobachten. Der Intraklassenkorrelationskoeffizient wurde auf $R = 0,86$ bestimmt ($p \leq 0,001$) und verweist auf eine sehr gute Vergleichbarkeit beider Ansätze (Abb. 20).

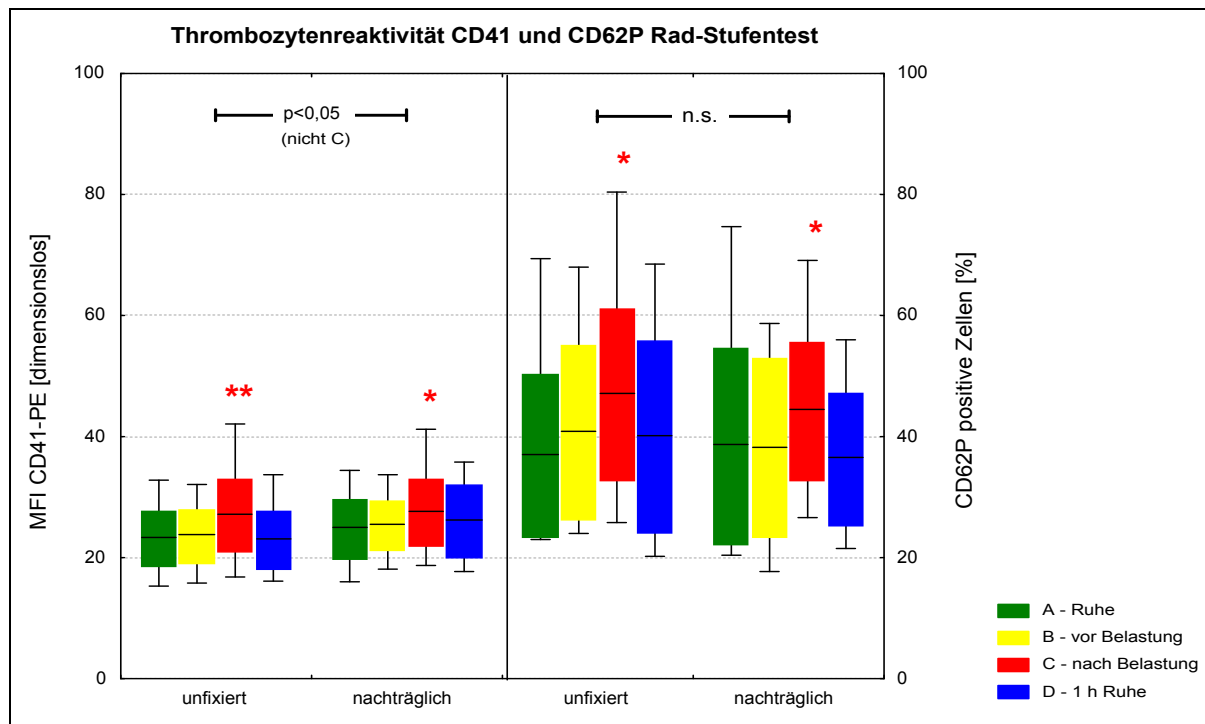


Abbildung 20: Thrombozytenreaktivität CD41 und CD62P nach Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 für unfixierte und nachträglich fixierte Thrombozyten im Rad-Stufentest; Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum-Maximum; n.s. - nicht signifikant; * - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. A, B u. D

In der Auswertung der aktivierungsabhängigen CD62P Expression ergaben sich für beide Ansätze keine signifikanten Unterschiede. Die Zunahme der Reaktivität der Thrombozyten nach Belastung wird in beiden Verarbeitungen sichtbar ($p \leq 0,05$). Eine Intraklassenkorrelation von $R=0,86$ ($p \leq 0,001$) unterstreicht den nur geringen Einfluss der nachträglichen Fixierung auf die CD62P-Expression der stimulierten Thrombozyten.

Vergleicht man die Oberflächenexpression von CD42b nach Stimulation mit 10 μ M ADP zwischen unfixierten und nachträglich fixierten Proben, so führte die nachträgliche Fixierung zu keiner messbaren Veränderung (Abb. 21). Der Intraklassenkorrelationskoeffizient wurde auf $R=0,90$ ($p \leq 0,001$) bestimmt und belegt den geringen Einfluß der nachträglichen Fixierung auf die Expression von CD42b bei vorausgegangener Stimulation mit ADP. Ein Einfluß der Belastungsintervention war in beiden Ansätzen nicht erkennbar.

Nach Stimulation mit 10 μ M ADP ergab sich für die unfixierten Proben in der Auswertung von PAC-1 ein durchschnittlicher Anteil von etwa 70 % aktivierten Thrombozyten. Demgegenüber zeigte sich das Aktivitätsniveau der nachträglich fixierten Proben mit Aktivitätswerten von im Mittel 80,5 % PAC-1 positiven Ereignissen hochsignifikant gesteigert ($p \leq 0,01$). Der Intraklassenkorrelationskoeffizient wurde auf $R=0,35$ ($p \leq 0,001$) bestimmt und verwies auf die geringe Vergleichbarkeit beider Methoden. Wie schon für die Laufbanduntersuchung (Tab. 9) war auch hier der Stimulationserfolg zu groß, um signifikante Unterschiede in der Thrombozytenreaktivität nach Belastung aufzudecken.

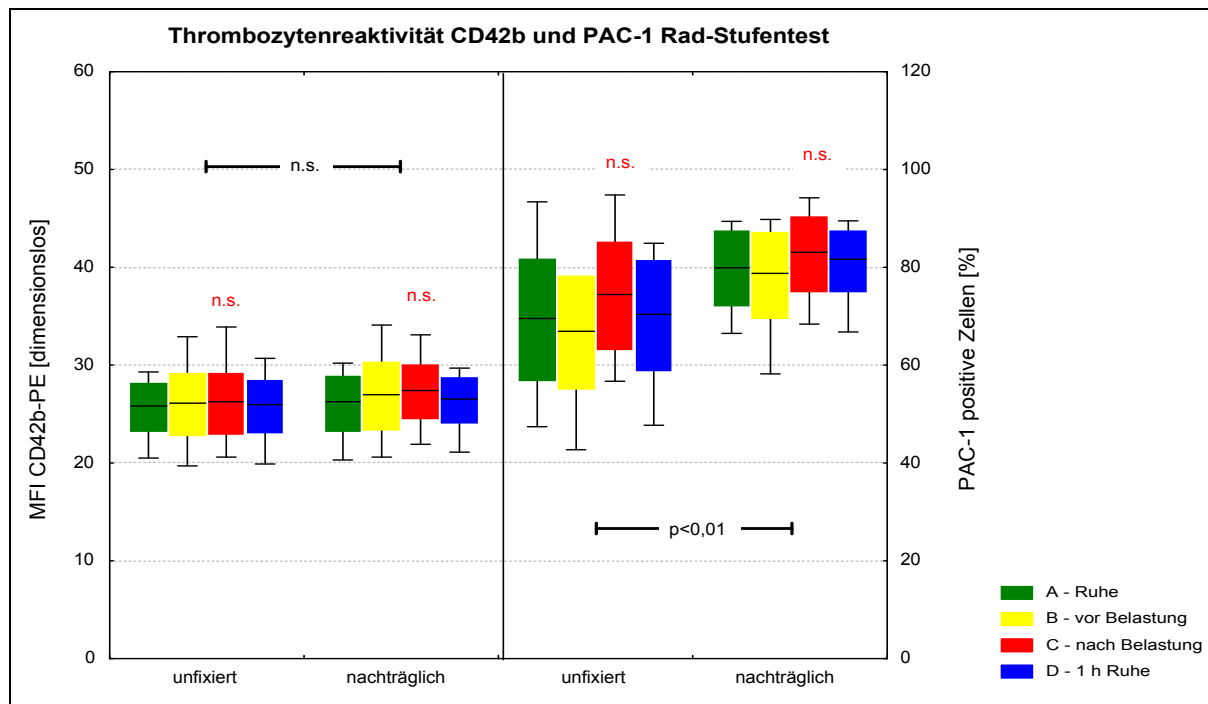


Abbildung 21: Thrombozytenreaktivität CD42b und PAC-1 nach Stimulation mit 10 μ M ADP für unfixierte und nachträglich fixierte Thrombozyten im Fahrradstufentest; Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum-Maximum; n.s. - nicht signifikant

Die vergleichsweise große Anfälligkeit der Bindungsstelle für PAC-1 für äußere Einflüsse wurde auch für die durchgeführten Messungen zur Probenstabilität deutlich (vgl. Abb. 22). Bei nachträglicher Fixierung der Proben mit 0,5 % Paraformaldehyd zeigte sich trotz der Lagerung bei 4 °C in Dunkelheit bereits nach 15 Minuten ein weiterer hochsignifikanter Anstieg des Anteils PAC-1 positiver Thrombozyten, der sich auch in den Folgemessungen weiterhin kontinuierlich fortsetzte ($p \leq 0,01$; Friedmans ANOVA). Hingegen fand sich in den unfixierten Proben bei gleicher Lagerung keine entsprechende Zunahme der PAC-1 Aktivität. In der Färbung mit CD62P belegen konstante Messwerte auch nach einer sowohl für die nachträgliche Fixierung als auch für die unfixierten Thrombozyten eine sehr gute Stabilität in der Immunfluoreszenzmarkierung von oberflächenexprimiertem P-Selektin. Ebenso zeigte sich, dass auch nach Stimulation mit ADP oder TRAP-6 die CD62P Expression von Thrombozyten im Vollblut bei Lagerung in Dunkelheit und 4°C über eine Stunde ohne eine weitere Fixierung absolut konstant blieb (vgl. Abb. 23).

Zusammenfassend darf an dieser Stelle festgehalten werden, dass in Folge einer Stufentestbelastung auch in einer Gruppe von gut trainierten Probanden eine geringe, aber signifikante Zunahme der Thrombozytenaktivität gefunden werden kann. Ebenso fand sich eine deutliche Zunahme der Thrombozytenreaktivität. Insbesondere die direkte Fixierung der Thrombozyten führte zu einer Aktivitätszunahme, welche den Einfluss der Belastungsintervention überdeckte. Die geringsten Veränderungen ergaben sich bei unfixierter Verarbeitung.

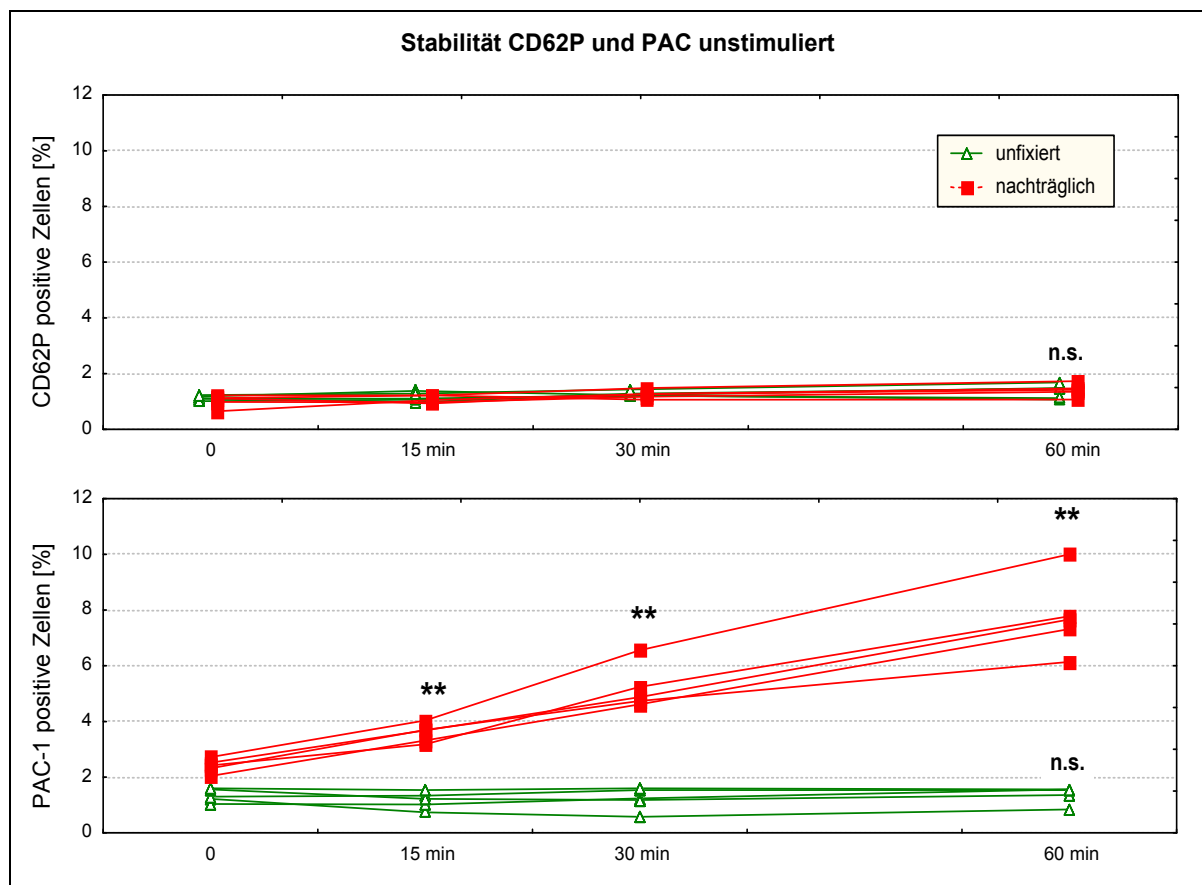


Abbildung 22: zeitliche Stabilität PAC-1 und CD62P für je 5 unfixierte und nachträglich fixierte Proben; n.s. - nicht signifikant; ** - $p \leq 0,01$ (Friedmans ANOVA)

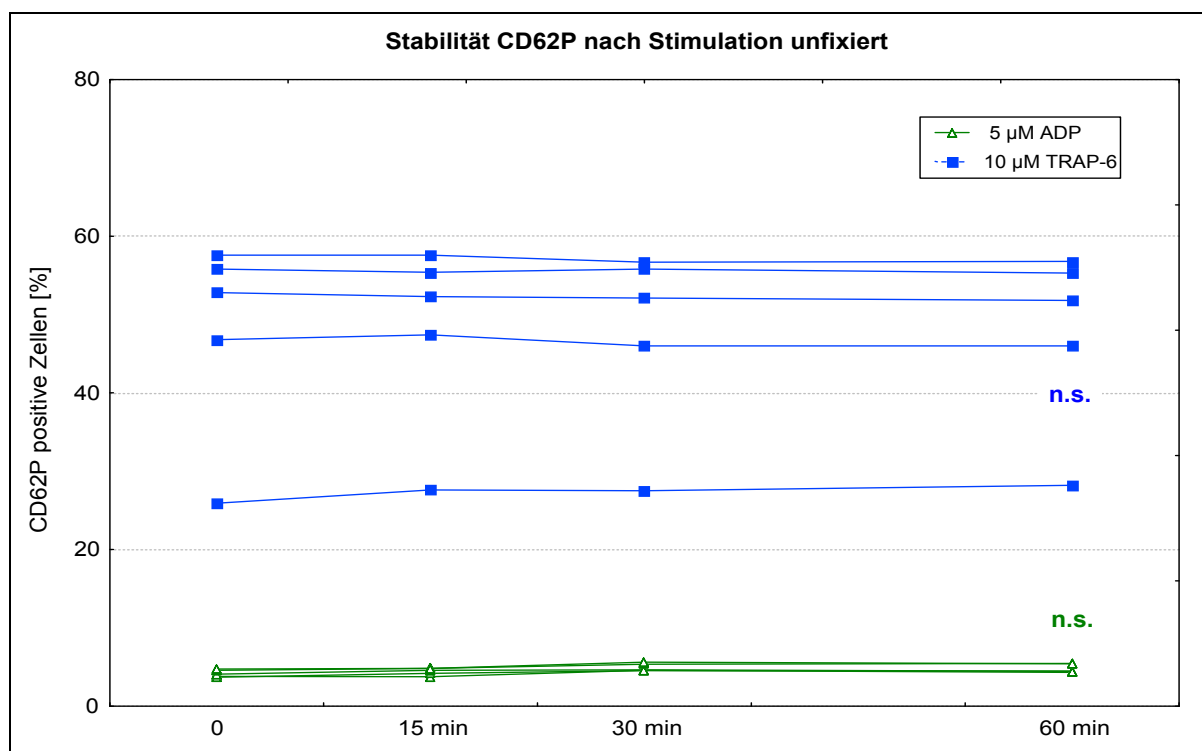


Abbildung 23: zeitliche Stabilität von CD62P für je 5 ADP und TRAP-6 stimulierten Proben ohne Fixierung n.s. - nicht signifikant (Friedmans ANOVA)

4.2 Teilstudie II – Dauertest

Teilstudie II setzt die Untersuchung der Thrombozytenaktivität und –reaktivität mit Hilfe der Marker CD41 und CD62P am Beispiel einer typischen Ausdauerbelastung fort. Auf methodischer Seite lag der Schwerpunkt auf dem Aufbau eines Protokolls zur Untersuchung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten und der erstmaligen Messung solcher Konjugate nach körperlicher Belastung.

4.2.1 Ergometriedaten

Alle Teilnehmer konnten die Belastung von 90 % der IAS über 60 Minuten aufrecht halten und 2 Probanden komplettierten sogar 120 Minuten. Gegenüber dem Ruhewert kam es zu einem signifikanten Laktatanstieg auf durchschnittlich $3,1 \pm 1,1$ mmol/l nach Belastung (Tab. 10). Die erreichten Laktatspiegel verweisen auf eine metabolische Beanspruchung, die ihren Energiebedarf partiell durch anaerobe Glycolyse deckt. Es darf vom Erreichen eines submaximalen Laktat-Steady-States ausgegangen werden.

Tabelle 9: Ergometrieergebnisse Dauertest; Laufgeschwindigkeit (V_{Test}), Testdauer, Laufstrecke, Ruhelaktat ($\text{Laktat}_{\text{Ruhe}}$) und Laktat zu Belastungsende ($\text{Laktat}_{\text{Bel.}}$); *** - $p \leq 0,001$ vs. $\text{Laktat}_{\text{Ruhe}}$

| Proband | V_{test} [m/s] | Dauer [min] | Strecke [km] | $\text{Laktat}_{\text{Ruhe}}$ [mmol/l] | $\text{Laktat}_{\text{Bel.}}$ [mmol/l] |
|-------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|---|---|
| Mittelwert \pm StAbw. | $3,1 \pm 0,4$ | 77 ± 20 | $14,1 \pm 4,2$ | $1,4 \pm 0,3$ | $3,1 \pm 1,1^{***}$ |
| Minimum - Maximum | 2,7 – 3,8 | 60 - 120 | 9,6 – 27,4 | 1,0 – 2,0 | 1,6 – 5,3 |

4.2.2 Blutbildveränderungen

Unmittelbar nach Belastung fand sich ein höchst signifikanter Anstieg der Thrombozyten ($p \leq 0,001$; vgl. Tab. 11). Nach Plasma-Volumen Korrektur entsprach dies einer Zunahme um durchschnittlich 44 Prozent gegenüber der Ruheabnahme. Zwei Stunden nach Belastungsende war die Thrombozytenzahl weitgehend rückläufig, wenngleich sich statistisch auch weiterhin ein signifikanter Unterschied gegenüber dem Ruhewert ergab ($p \leq 0,01$). Die Zunahme der Thrombozytenzahl wurde von einem moderaten Abstieg der Thrombozytengröße (MPV) begleitet, der jedoch mit $p = 0,059$ das festgesetzte Signifikanzniveau knapp verfehlte.

Parallel zum Anstieg der Thrombozytenzahl erhöhte sich auch die Zahl der zirkulierenden Leukozyten. Die beobachtete belastungsinduzierte Leukozytose entsprach einer Zunahme um durchschnittlich 92 Prozent und war im Gegensatz zur Thrombozytose mit einem Anstieg um 102 Prozent auch 2 Stunden nach Belastungsende noch nicht wieder reversibel (jeweils $p \leq 0,001$). Ein Blick auf das Differentialblutbild verweist dabei auf ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Zellreihen. Während die Zunahme der Leukozyten unmittelbar nach Belastungsende auf einem überproportionalen Anstieg der Lymphozyten beruhte, wurde die

anhaltend hohe Leukozytenzahl zwei Stunden nach Belastung nahezu ausschließlich durch eine Zunahme der Granulozytenzahl hervorgerufen.

Tabelle 11: Thrombozytenzahl, mittleres Thrombozytenvolumen (MPV) und Differentialblutbild Dauertest vor und nach Belastung; Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum – Maximum; ** - $p \leq 0,01$ u. *** $p \leq 0,001$ vs. Ruhe; ### - $p \leq 0,001$ vs. Belastungsende

| | Ruhe | Belastungsende | 2 h Ruhe |
|--------------------------------|--|--|--|
| Thrombozyten [Gpt/l] | 210\pm45 (134-275) | 300\pm54*** 207-391 | 219\pm46** ### 136-286 |
| MPV [fl] | 6,21\pm0,45 5,5-7,3 | 6,38\pm0,58 5,7-7,4 | 6,34\pm0,46 5,7-7,4 |
| Leukozyten [Gpt/l] | 5,0\pm1,2 3,2-8,3 | 9,6\pm2,4*** 6,4-16,0 | 10,1\pm2,0*** 7,8-14,7 |
| Granulozyten [Gpt/l] | 2,7\pm0,9 1,5-5,6 | 5,0\pm1,6*** 3,2-10,0 | 8,0\pm1,9*** ### 5,7-12,1 |
| Monozyten [Gpt/l] | 0,4\pm0,1 0,3-0,7 | 0,6\pm0,2*** 0,3-0,9 | 0,5\pm0,1** 0,3-0,8 |
| Lymphozyten [Gpt/l] | 1,9\pm0,5 1,2-3,1 | 3,9\pm1,2*** 2,4-6,3 | 1,6\pm0,3** ### 1,1-2,0 |

4.2.3 Thrombozytenaktivität und -reaktivität

Die Ergebnisse der Thrombozytenaktivität vor und nach Belastung sind in Abbildung 24 zusammengefasst. Mit durchschnittlich $1,6 \pm 0,6$ % CD62P positiven Thrombozyten vor und $1,7 \pm 0,8$ % nach Belastung blieb die Thrombozytenaktivität durch die Dauerbelastung unverändert. Ebenso ergaben sich auch für die mittlere Fluoreszenzintensität von CD41-PE keine signifikanten Unterschiede.

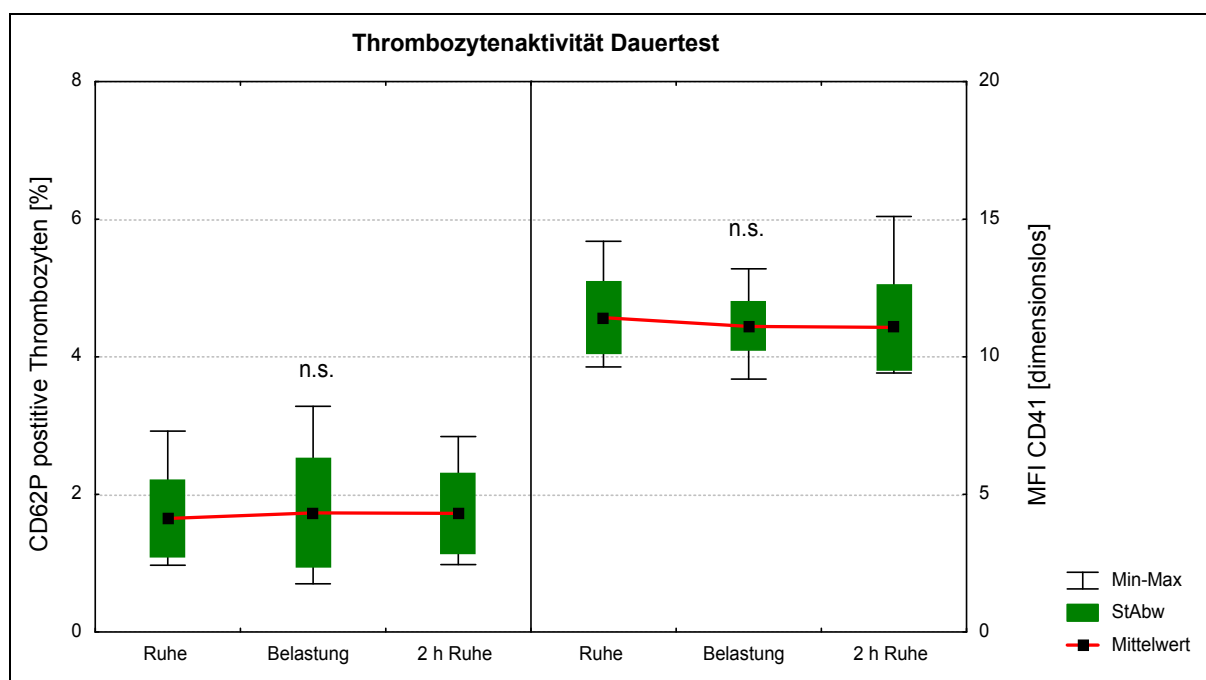


Abbildung 24: Thrombozytenaktivität Dauertest; Auswertung nach %-positiven Zellen CD62P und mittlerer Fluoreszenzintensität für CD41-PE; Ruhe und 2 h Ruhe; n.s. – nicht signifikant

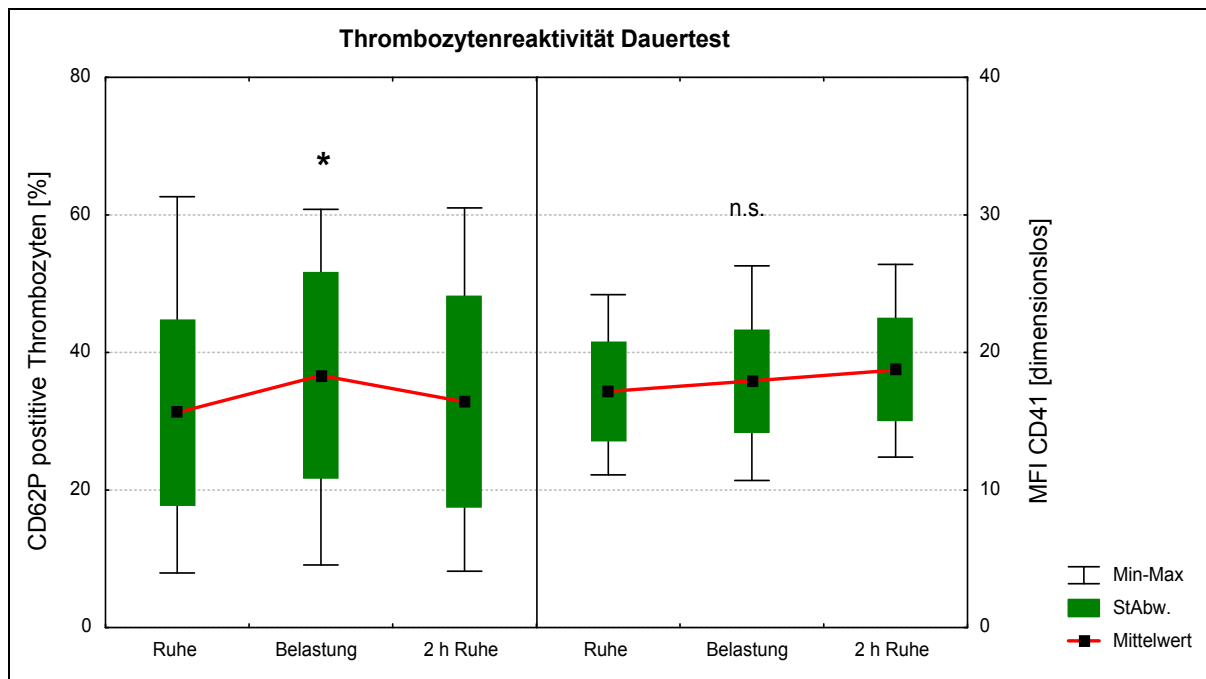


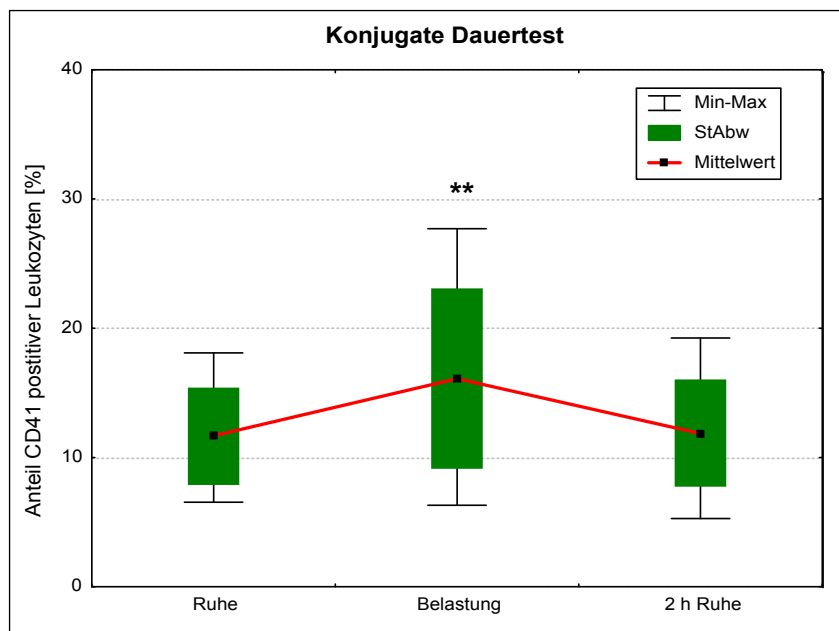
Abbildung 25: Thrombozytenreaktivität Dauertest; Auswertung nach %-positiven Zellen CD62P und mittlerer Fluoreszenzintensität für CD41-PE; *- $p \leq 0,05$ vs. Ruhe und 2 h Ruhe; n.s. – nicht signifikant

Im Gegensatz zur Thrombozytenaktivität fand sich nach Stimulation mit $7,5 \mu\text{M}$ TRAP-6 eine gesteigerte Reaktivität in Folge des Dauertests. So nahm die Zahl CD62P positiver Thrombozyten von durchschnittlich $31,3 \pm 13,4 \%$ in Ruhe auf $36,7 \pm 14,9 \%$ nach Belastung zu. Die Zunahme der Reaktivität war mit $p \leq 0,05$ statistisch signifikant und nach 2 Stunden Ruhe vollständig reversibel. In der Auswertung der MFI für CD41-PE als einem indirektem Aktivierungsmarker fanden sich keine signifikanten Veränderungen (vgl. Abb. 25).

4.2.4 Thrombozyten-Leukozyten Konjugate

Erstmals in der sportmedizinischen Untersuchung erfolgte die Analyse von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten. Abbildung 26 gibt die Ergebnisse zur Konjugatbildung vor und nach Belastungsintervention wieder. In Ruhe besaßen $11,7 \pm 3,7 \%$ der untersuchten Leukozyten eine messbare Oberflächenaktivität für den thrombozytenspezifischen CD41 Antikörper und konnten somit als Konjugate identifiziert werden. Unmittelbar nach Belastung stieg der Anteil an Konjugaten hochsignifikant auf durchschnittlich $16,1 \pm 6,8 \%$ an ($p \leq 0,01$). Dieser Anstieg entsprach einer relativen Zunahme um durchschnittlich 38 %. Faßt man darüber hinaus auch die gleichzeitige Verdopplung der Leukozytenzahl nach der Belastung (Tab. 10) ins Auge, so errechnet sich daraus eine Zunahme der absoluten Anzahl zirkulierender Konjugaten um durchschnittlich 164 Prozent (!) gegenüber dem Ausgangswert in Ruhe. Mit $11,9 \pm 4,7 \%$ kehrte der relative Anteil an Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten 2 Stunden nach Belastung auf das Ausgangsniveau in Ruhe zurück. Es muß jedoch beachtet werden, dass

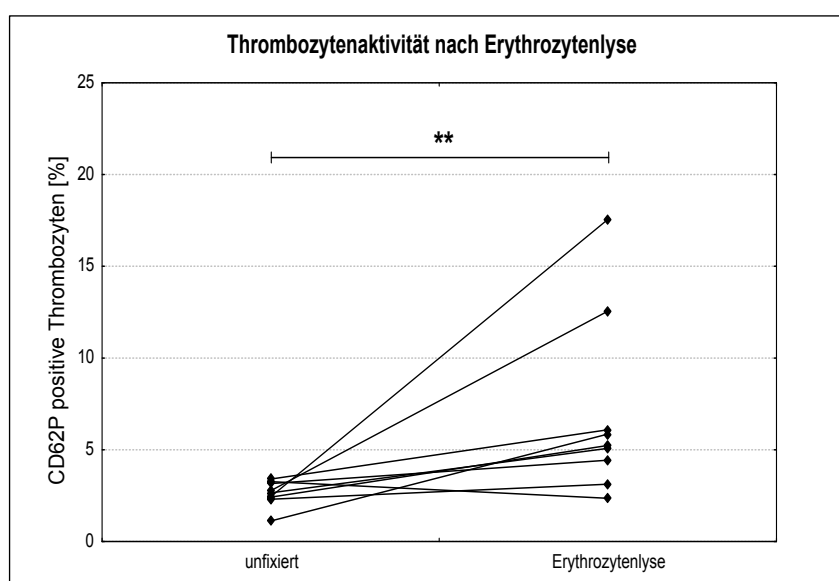
angesichts der auch 2 Stunden nach Belastung noch fortbestehenden Leukozytose die absolute



Anzahl zirkulierender Konjugate weiterhin erhöht blieb.

Abbildung 26:
Thrombozyten-Leukozyten Konjugate Dauertest;
** - $p \leq 0,01$ vs. Ruhe und 2 h Ruhe

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von Leukozyten ist die Durchführung einer Erythrozytenlyse weit verbreitet. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden in Teilstudie II für den Aufbau eines Protokolls zur Messung von Konjugaten auch Versuche zur Thrombozytenaktivität nach Erythrozytenlyse vorgenommen. Diese sind in Abbildung 27 wiedergegeben. Nach der automatisierten Lyse der Erythrozyten mit Hilfe des ImmunoPrep Reagent System® und der TQ-Prep Workstation® zeigte sich schon für die ersten Probanden eine offensichtliche Zunahme der Thrombozytenaktivität. Bereits in einer Zwischenauswertung nach 9 Probanden konnte eine hochsignifikante Steigerung der Thrombozytenaktivität nach Lyse registriert werden ($p \leq 0,01$), sodass aufgrund der Eindeutigkeit auf eine weitere



Fortsetzung der Versuche zur Erythrozytenlyse verzichtet wurde.

Abbildung 27:
Thrombozytenaktivität nach unfixierter Aufbereitung und Erythrozytenlyse;
Auswertung nach % CD62P positiven Zellen;
** - $p \leq 0,01$ (Wilcoxon-Test)

Für die Untersuchung der zeitlichen Stabilität der Thrombozyten-Leukozyten Konjugate wurden für 10 Probanden die Proben nach der eigentlichen Messung am Durchflusszytometer in das Eiswasser zurückgestellt und weiterhin bei 4° C und Dunkelheit gelagert. Erneute Messungen erfolgten dann nach 20 und 60 Minuten. Abbildung 28 belegt eine kontinuierliche und statistisch hochsignifikante Zunahme des Anteils an Konjugaten von durchschnittlich $10,8 \pm 2,4$ % bei sofortiger Messung über $14,9 \pm 1,6$ % nach 20 Minuten auf $20,5 \pm 1,8$ % nach einer Stunde Lagerung (jeweils $p \leq 0,01$).

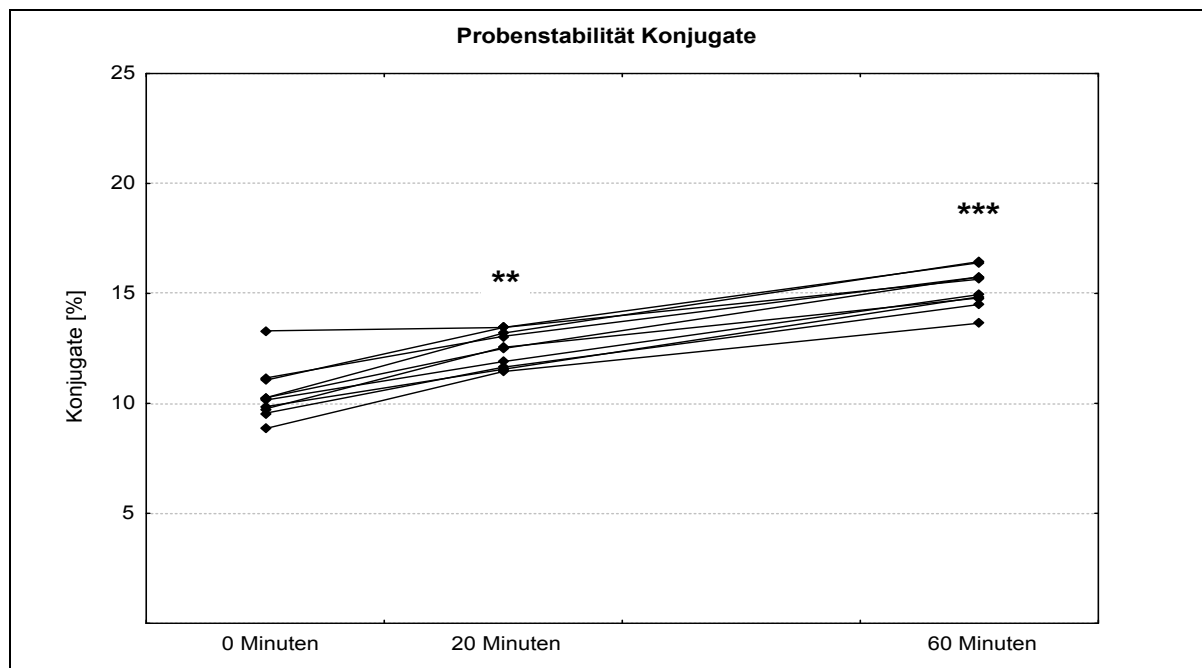


Abbildung 28: Probenstabilität Thrombozyten-Leukozyten Konjugate bei sofortiger Analyse und Messung der gleichen Proben nach 20 bzw. 60 Minuten; ** - $p \leq 0,01$ und *** - $p \leq 0,001$

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der untersuchten Probandengruppe eine Ausdauerbelastung bei einer Intensität von 90 % der IAS über mindestens 60 Minuten zu keiner Zunahme der Thrombozytenaktivität führte. Demgegenüber fand sich jedoch eine signifikante Zunahme der Thrombozytenreaktivität. Die stärksten Veränderungen in Folge der Belastungsintervention ergaben sich jedoch für die erstmalig durchgeführte Messung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten.

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten nach Belastung wäre eine weitere Differenzierung der Konjugatbildung nach Leukozytensubpopulationen wünschenswert. Aufgrund des eindeutig aktivierenden Effekts einer Erythrozytenlyse auf die Thrombozytenfunktion wurde in der weiteren Methodenentwicklung auf erneute Lyseversuche verzichtet.

4.3 Teilstudie III - Kurzzeitbelastung

Teilstudie III untersuchte erstmalig den Einfluss einer hochintensiven Kurzzeitbelastung auf die Thrombozytenfunktion. Dabei stellte sich die Frage, ob durch eine größt mögliche Belastungsintensität eine Zunahme der Thrombozytenaktivität in vivo provoziert werden kann. Auf methodischer Seite wurde die Untersuchung von Konjugaten mit dem Ziel einer Differenzierung nach Leukozytensubpopulationen weiter vorangetrieben.

4.3.1 Ergometriedaten

Alle Probanden konnten die gesamten 90 Sekunden der geplanten Testdauer komplettieren. Die während des Tests erreichte Spitzenleistung (peak power) lag bei 954 ± 147 Watt und verweist auf die hohe Motivation der Probanden, schon von Testbeginn an maximale Leistung zu erbringen. Innerhalb von nur 90 Sekunden stieg dabei die Herzfrequenz von 89 ± 18 auf 189 ± 12 Schläge pro Minute als Hinweis auf die schlagartig zunehmende Beanspruchung der Leistung des Herz-Kreislaufsystems an. Die Zunahme der Herzfrequenz unterschied sich höchst signifikant von den unveränderten Herzfrequenzwerten während des Kontrollversuchs mit durchschnittlich 84 ± 15 Schlägen pro Minute ($p \leq 0,001$).

Die hohe metabolische Beanspruchung und der stark anaerobe Charakter des 90-Sekunden Tests erschließt sich bei einem Blick auf die gemessenen Laktatwerte (vgl. Tab. 12). Während die moderate Aufwärmphase das Ruhelaktat von 1,0 mmol/l unberührt ließ, stieg der Wert unmittelbar nach den Belastung auf 11,0 mmol/l an. Mit durchschnittlich 15,1 mmol/l wurde das Maximum etwa 5 Minuten nach Testende erreicht und auch nach einer Stunde war der Laktatspiegel noch nicht wieder auf das Ruheniveau zurückgekehrt (jeweils $p \leq 0,001$).

Tabelle 12: Laktat 90-Sekunden Test; Mittelwert \pm Standardabweichung;
*** - $p \leq 0,001$ vs. Ruhe; ### $p \leq 0,001$ Kontrolle vs. 90-Sekunden-Test

| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 3 min | 5 min | 10 min | 60 min |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 90 s Test | 1,0 $\pm 0,3$ | 1,0 $\pm 0,2$ | 11,0*** $\pm 2,5$ | 14,2*** $\pm 1,4$ | 15,1*** $\pm 1,6$ | 13,6*** $\pm 2,7$ | 3,2*** $\pm 0,9$ |
| Kontrolle | 1,1 $\pm 0,5$ | / | 1,0### $\pm 0,2$ | / | / | / | / |

Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der Katecholaminbestimmung vor und nach Belastung zusammen. Bereits die moderate Aufwärmphase führte zu einem signifikanten Anstieg der Katecholamine, der sich an beiden Untersuchungstagen nicht unterscheidet. Zeigte sich innerhalb des 90-sekündigen Sitzens auf dem Ergometer für den Kontrollversuch bereits wieder ein Rückgang der gemessenen Werte, so kam es nach dem eigentlichen Belastungstest zu einer massiven Zunahme der Katecholamine ($p \leq 0,001$). Bezogen auf den Ruhewert stieg

der Adrenalin Spiegel durchschnittlich auf das 32-fache und der Noradrenalin Spiegel auf das 33-fache an. Nach 15 Minuten in Ruhe fanden sich bereits wieder deutlich rückläufige Konzentrationen, die eine Stunde nach Belastungsende das Ruheniveau erreicht hatten.

Tabelle 13: Katecholamine 90-Sekunden Test; Mittelwert \pm Standardabweichung;

** - $p \leq 0,01$ u. *** - $p \leq 0,01$ vs. Ruhe; ## - $p \leq 0,01$ u. ### $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle

| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
|------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| | Adrenalin [pg/ml] | | | | |
| 90s Test | 38 \pm 51 | 57 \pm 56** | 1215 \pm 806***### | 79 \pm 69***## | 34 \pm 35 |
| Kontrolle | 35 \pm 28 | 64 \pm 65** | 46 \pm 67 | 40 \pm 47 | 33 \pm 36 |
| | Noradrenalin [pg/ml] | | | | |
| 90s Test | 279 \pm 170 | 626 \pm 207*** | 9892 \pm 3947***### | 1215 \pm 600***### | 291 \pm 212 |
| Kontrolle | 272 \pm 183 | 628 \pm 240*** | 537 \pm 267*** | 278 \pm 155 | 276 \pm 169 |

4.3.2 Blutbildveränderungen

An beiden Untersuchungstagen zeigte sich nach dem Aufwärmen ein moderater Anstieg der Thrombozytenzahl, der mit $p \leq 0,01$ jeweils signifikant war und sich zwischen den Versuchstagen nicht unterschied (vgl. Tab. 14). Demgegenüber ergab sich unmittelbar nach Belastung keinerlei Veränderung der Thrombozytenzahl. Wie bereits in den Vorversuchen zeigte sich eine Zunahme der Thrombozytenzahl erst 15 Minuten nach Belastungsende. Bezogen auf den Ausgangswert unmittelbar vor Belastung entspricht diese einem moderaten Anstieg um durchschnittlich 14 Prozent und unterschied sich jeweils signifikant von den Werten vor Belastung und den Werten des Kontrollversuches. Eine Stunde nach Belastungsende war der Anstieg der Thrombozytenzahl vollständig reversibel. Demgegenüber fand sich für die Größe der Thrombozyten ein komplett unterschiedlicher Verlauf. Während das mittlere Plättchen-volumen (MPV) nach der Aufwärmphase unverändert blieb, stieg das MPV unmittelbar nach Belastungsende signifikant an und war bereits nach 15 Minuten wieder rückläufig.

Auch für die Zahl der zirkulierenden Leukozyten führte die Aufwärmphase an beiden Tagen zu einem moderaten aber signifikanten Anstieg gegenüber dem Ausgangswert in Ruhe. In Folge der Belastungsintervention zeigte sich dann eine rasche Zunahme der Leukozytenzahl von durchschnittlich 5,0 Gpt/l vor Belastung auf 8,0 bzw. 7,9 Gpt/l unmittelbar und 15 Minuten nach Belastung. Diese Zunahme unterschied sich auch hochsignifikant von den Werten der Kontrolluntersuchung. Im Gegensatz zur Zunahme der Leukozytenzahl nach einer Dauerbelastung (vgl. Teilstudie II) stützte sich nach dieser maximalen Kurzzeitbelastung der Anstieg der Leukozytenzahl in erster Linie auf einen überproportionalen Anstieg der Lymphozyten. Eine Stunde nach Belastung waren alle Veränderungen vollständig reversibel.

Tabelle 14: Thrombozytenzahl [Gpt/l] und mittleres Thrombozytenvolumen MPV [fl] sowie Differentialblutbild [Gpt/l] im 90-Sekunden Test; Mittelwert \pm Standardabweichung, §§ - $p \leq 0,01$ vs Ruhe; * - $p \leq 0,05$ u. *** - $p \leq 0,001$ vs. Warm-up; # - $p \leq 0,05$ u. ### $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle

| | Ruhe | Warm-up | Belastung | 15 min | 60 min |
|---------------------|-----------------------------------|--|--|--|-----------------------------------|
| | 90 Sekunden Test | | | | |
| Thrombozyten | 214 \pm 48 | 229 \pm 60^{§§} | 236 \pm 47 | 260 \pm 66^{***###} | 211 \pm 50 |
| MPV | 6,06 \pm 0,60 | 6,14 \pm 0,65 | 6,57 \pm 0,70^{*#} | 6,37 \pm 0,81 | 6,15 \pm 0,68 |
| Leukozyten | 4,6 \pm 0,6 | 5,0 \pm 0,7^{§§} | 8,0 \pm 1,2^{***###} | 7,9 \pm 1,6^{***###} | 4,4 \pm 0,8 |
| Granulozyten | 2,6 \pm 0,6 | 2,8 \pm 0,7^{§§} | 3,4 \pm 0,8^{***###} | 3,7 \pm 0,9^{***###} | 2,9 \pm 0,8 |
| Monozyten | 0,3 \pm 0,1 | 0,4 \pm 0,1^{§§} | 0,6 \pm 0,2^{***###} | 0,7 \pm 0,3^{***###} | 0,3 \pm 0,1 |
| Lymphozyten | 1,7 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,3^{§§} | 4,0 \pm 0,8^{***###} | 3,5 \pm 1,0^{***###} | 1,2 \pm 0,2 |
| | Kontrolle | | | | |
| Thrombozyten | 206 \pm 54 | 226 \pm 54^{§§} | 227 \pm 60 | 217 \pm 62 | 212 \pm 52 |
| MPV | 6,06 \pm 0,75 | 6,07 \pm 0,74 | 6,20 \pm 0,73 | 5,95 \pm 0,68 | 5,97 \pm 0,63 |
| Leukozyten | 4,4 \pm 0,8 | 4,7 \pm 0,8^{§§} | 5,1 \pm 0,8 | 4,2 \pm 0,8 | 4,2 \pm 0,9 |
| Granulozyten | 2,5 \pm 0,8 | 2,7 \pm 0,8^{§§} | 2,8 \pm 0,9 | 2,4 \pm 0,7 | 2,4 \pm 0,8 |
| Monozyten | 0,3 \pm 0,1 | 0,3 \pm 0,1 | 0,4 \pm 0,1 | 0,3 \pm 0,1 | 0,3 \pm 0,1 |
| Lymphozyten | 1,6 \pm 0,3 | 1,7 \pm 0,3^{§§} | 1,9 \pm 0,3 | 1,5 \pm 0,2 | 1,5 \pm 0,2 |

4.3.3 Thrombozytenaktivität und -reaktivität

Die Ergebnisse der Thrombozytenaktivität im Verlauf des 90-Sekunden-Tests sind in Abbildung 30a zusammengefasst. Mit durchschnittlich $1,9 \pm 0,6$ und $1,8 \pm 0,6$ % CD62P positiven Thrombozyten in Ruhe und nach dem Aufwärmen sowie $1,8 \pm 0,5$ bzw. $2,0 \pm 0,9$ % unmittelbar sowie 15 Minuten nach Belastung blieb sowohl die Aufwärmphase als auch die maximal intensive Kurzzeitbelastung ohne einen Einfluss auf die messbare Thrombozytenaktivität für CD62P. Ebenso ließen sich auch für die mittlere Fluoreszenzintensität von CD41-PE keine signifikanten Unterschiede vor und nach Belastung nachweisen.

Auch nach Stimulation mit TRAP-6 blieb die Reaktivität der Thrombozyten durch die Aufwärmphase an beiden Versuchstagen unverändert (vgl. Abb. 30b). Demgegenüber stieg der Anteil an CD62P positiven Thrombozyten von durchschnittlich $40,6 \pm 9,5$ % vor Beginn des 90-Sekunden Tests auf im Mittel $50,8 \pm 12,1$ % unmittelbar nach Belastungsende an. Beide Werte unterschieden sich im Wilcoxon-Test mit $p \leq 0,01$ hoch signifikant voneinander, zeigten aber keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Werteverlauf im Kontrollversuch. Mit einem weiteren Anstieg auf $51,7 \pm 10,2$ % CD62P positive Thrombozyten war die Reaktivität auch 15 Minuten nach Belastungsende noch deutlich gesteigert. Dieser weitere Anstieg unterschied sich nun jeweils hoch signifikant von den Ausgangswerten vor Beginn der 90-sekündigen Maximalbelastung und dem Werteverlauf im Kontrollversuch.

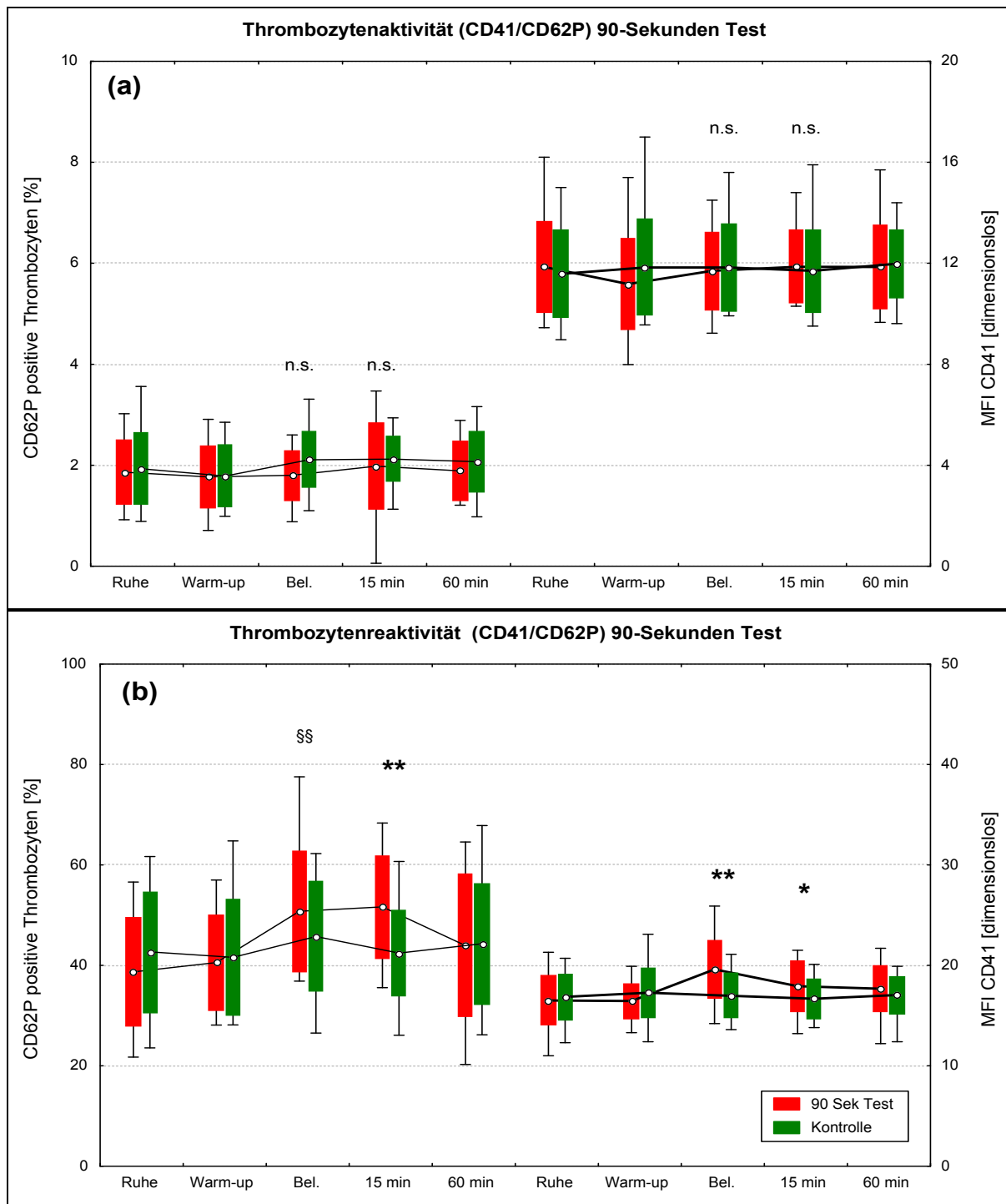


Abbildung 29: Thrombozytenaktivität (a) und Reaktivität nach Stimulation mit TRAP-6 (b) 90-Sekunden Test; Auswertung nach %-positiven Zellen CD62P und mittlerer Fluoreszenzintensität für CD41-PE; Mittelwert \pm Standardabweichung (Minimum-Maximum); n.s. – nicht signifikant; * - $p < 0,05$ u. ** - $p < 0,01$ vs. Ruhe/Warm-up und Kontrolle; §§ - $p < 0,01$ vs. Ruhe/Warm-up nicht aber Kontrolle

Auch in der Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität für CD41-PE zeigte sich nach Stimulation eine hochsignifikante Zunahme der MFI von $16,5 \pm 1,8$ unmittelbar vor Beginn des 90-Sekunden-Tests auf durchschnittlich $19,6 \pm 2,9$ nach Belastung [ohne Einheit]. Auch 15 Minuten nach Testende war die MFI für CD41-PE mit $17,9 \pm 2,5$ noch signifikant gegenüber den Ausgangswerten und dem Kontrollversuch erhöht. Eine Stunde nach Be-

lastungsende ließen sich keine signifikanten Unterschiede mehr feststellen. Innerhalb des Kontrollversuches ergab sich für keinen der Parameter eine messbare Veränderung.

Mit dem CD63 Antikörper wurde in dieser Teilstudie ein weiterer Aktivierungsmarker zur Untersuchung der Thrombozytenaktivität eingesetzt. Bei einer durchschnittlichen CD63-Aktivität von $4,4 \pm 1,9$ % CD63 positiven Thrombozyten in Ruhe und $4,3 \pm 2,2$ % nach dem Aufwärmen sowie $5,0 \pm 2,0$ % unmittelbar nach Belastung deutete sich eine geringe Zunahme der Aktivität durch die Belastungsintervention an. Im direkten Vergleich mit den Ausgangswerten vor Belastung und den Werten im Kontrollversuch ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Im Mittel aller Messungen lag der Anteil an CD63 positiven Thrombozyten bei ca. 4,5 Prozent und damit mehr als doppelt so hoch wie der Anteil an CD62P positiven Zellen. Zu allen Untersuchungszeitpunkten unterschieden sich die CD63 und die CD62P Expression jeweils hochsignifikant voneinander ($p < 0,01$).

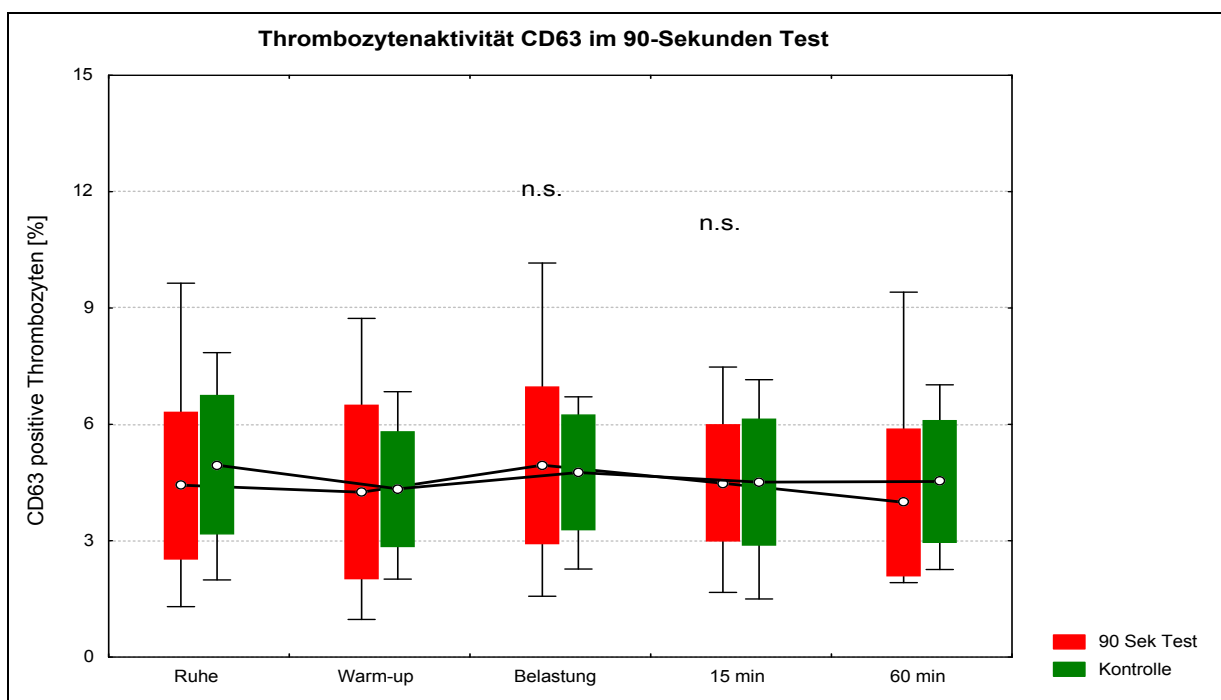


Abbildung 30: Thrombozytenaktivität während des 90-Sekunden-Tests; Auswertung nach %-positiven Zellen für CD63; Mittelwert \pm Standardabweichung (Minimum-Maximum); n.s. – nicht signifikant

4.3.4 Thrombozyten-Leukozyten Konjugate

Durch die vorgenommene Erweiterung der Methodik war es möglich, die Bildung von Konjugaten getrennt nach Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu untersuchen. Erwartungsgemäß zeigte sich eine unterschiedliche Neigung der einzelnen Subpopulationen zur Bildung von Thrombozytenkonjugaten mit den höchsten Werten für Monozyten und der geringsten Neigung bei Lymphozyten. Abbildung 32 fasst die Ergebnisse zusammen.

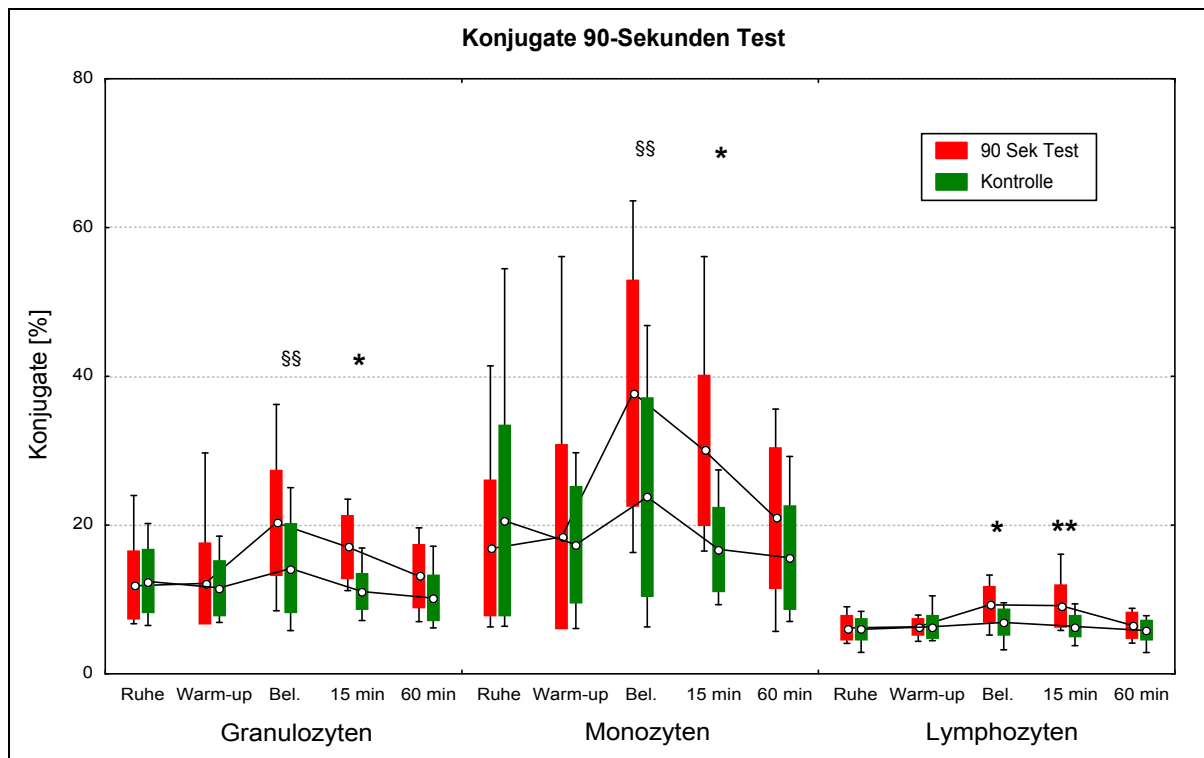


Abbildung 31: Anteil an Konjugaten während des 90-Sekunden-Tests Auswertung nach %-positiven Zellen für CD41 von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten; Mittelwert \pm Standardabw. (Minimum-Maximum)
 * - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. Ruhe/Warm-up und Kontrolle; §§ - $p \leq 0,01$ vs. Ruhe/Warm-up nicht Kontrolle

An beiden Versuchstagen blieb die Aufwärmphase ohne einen messbaren Einfluss auf die Konjugatbildung. Demgegenüber führte die 90-sekündige Maximalbelastung zu einer deutlichen Zunahme der Konjugate, während die gemessenen Werte innerhalb des Kontrollversuchs unverändert blieben. So stieg der Anteil an Granulozytenkonjugaten von $12,2 \pm 5,5$ % unmittelbar vor auf durchschnittlich $20,3 \pm 7,1$ % nach Belastung an. Beide Werte zeigten mit $p \leq 0,01$ einen hochsignifikanten Unterschied. Aufgrund einer geringen und in sich selbst nicht signifikanten Zunahme innerhalb des Kontrollversuchs wurde das gesetzte Signifikanzniveau im Vergleich zu den Werten des Kontrollversuchs mit $p = 0,07$ jedoch knapp verfehlt. Fünfzehn Minuten nach Belastungsende zeigte sich der Anteil an Granulozytenkonjugaten mit $17,0 \pm 4,3$ % zwar schon wieder leicht rückläufig, wies nun aber einen signifikanten Unterschied auch gegenüber dem Kontrollversuch auf ($p \leq 0,05$).

In der Auswertung der Monozytenkonjugate stieg der Anteil von $18,4 \pm 12,4$ Prozent nach dem Aufwärmen auf $37,8 \pm 15,1$ Prozent direkt nach dem 90-Sekunden-Test. Auch dieser Anstieg war für sich genommen hochsignifikant, wies aber im Vergleich zum Kontrollversuch direkt nach Belastungsende keinen signifikanten Unterschied auf. Erneut stellte sich ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle und den Vorbelastungswerten erst 15 Minuten nach Belastungsende ein. Zu diesem Zeitpunkt war der Anteil an Monozytenkonjugaten mit $30,1 \pm 10,2$ Prozent bereits wieder leicht rückläufig.

Demgegenüber besaßen die Lymphozyten die geringste Neigung zur Konjugatbildung. Hier stieg der Anteil an Konjugaten von $6,3 \pm 1,0$ % unmittelbar vor dem 90-Sekunden Test auf $9,3 \pm 2,4$ % unmittelbar nach und auf $9,2 \pm 2,8$ % 15 Minuten nach Belastung an. Beide Anstiege unterschieden sich mit $p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ jeweils signifikant von den Werten des Kontrollversuchs und gegenüber den Ausgangswerten vor Belastung. Alle gefundenen Veränderungen waren 1 Stunde nach Belastung jeweils vollständig reversibel.

Abbildung 33 gibt einen Überblick über die Konjugatbildung in der Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität für CD41-PE. Während die Auswertung nach positiven Zellen den prozentualen Anteil an Konjugaten wiedergibt, liefert die Auswertung der MFI für CD41 einen Hinweis auf die Antigenmenge des thrombozytären GP IIb/IIIa Rezeptors, welche durchschnittlich von den Leukozyten gebunden wurde.

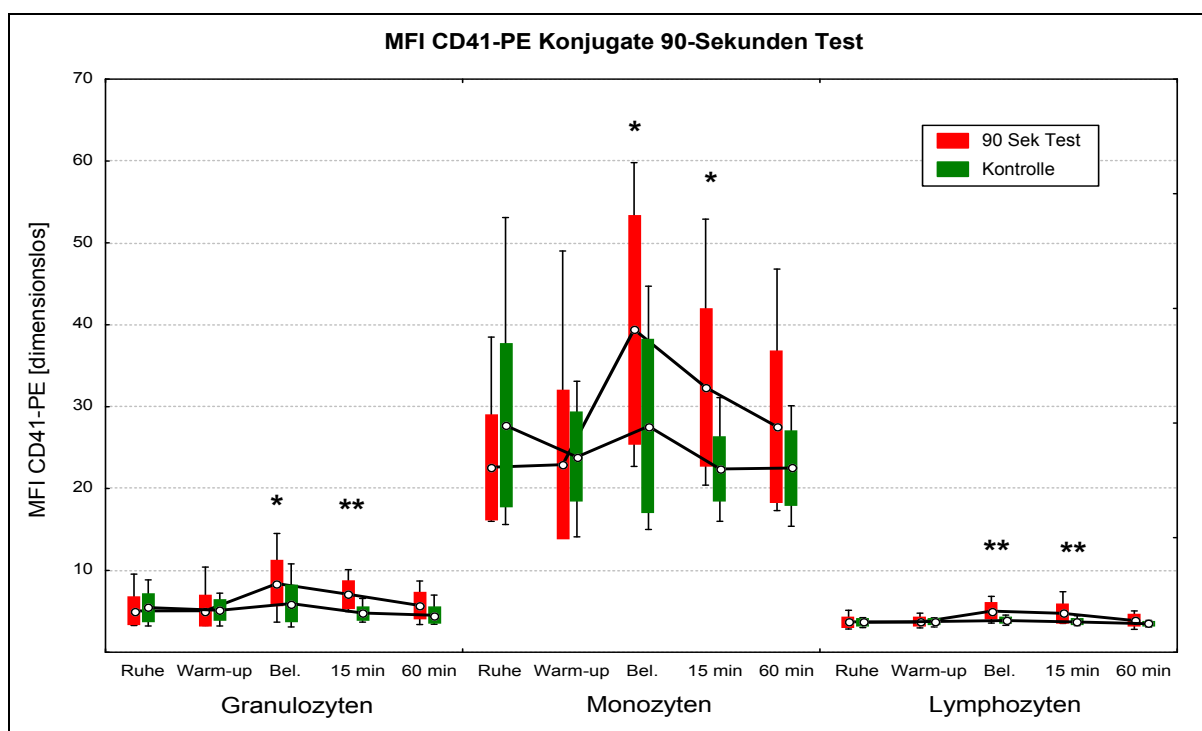


Abbildung 32: mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD41-PE von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten; Mittelwert \pm Standardabweichung (Minimum-Maximum)
 * - $p \leq 0,05$ u. ** - $p \leq 0,01$ vs. Ruhe/Warm-up und Kontrolle;

Auch in der Auswertung der MFI für CD41-PE wird die nach Belastung gesteigerte Neigung zur Konjugatbildung deutlich, während sich im Kontrollversuch keine signifikanten Veränderungen zeigten. Auffällig war dabei, dass die Auswertung der MFI für CD41-PE zwischen den drei Leukozytensubpopulationen und in der Auswirkung des 90-Sekunden Tests größere Unterschiede offenbarte als dies in der Auswertung nach % positiven Zellen zu erkennen gewesen war. Für die Granulozyten nahm der Wert der MFI von $5,1 \pm 1,9$ unmittelbar vor Belastung auf $8,4 \pm 1,8$ bzw. $7,0 \pm 1,7$ direkt und 15 Minuten nach Belastung zu [ohne

Einheit]. Demgegenüber zeigten die Monozyten im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine um ein Vielfaches stärkere Bindungsneigung für CD41-PE ($p \leq 0,01$). Ausgehend von einem Wert um $22,9 \pm 9,1$ vor Belastung stieg hier die MFI für CD41-PE auf durchschnittlich $39,5 \pm 13,9$ bzw. $32,3 \pm 9,6$ nach Belastung an. Für die Lymphozyten ergab sich eine moderate Zunahme von $3,7 \pm 0,5$ auf Werte von $5,0 \pm 1,0$ und $4,7 \pm 1,1$. Alle genannten Veränderungen unterschieden sich jeweils signifikant von den Ausgangswerten vor Belastungsbeginn und dem Kontrollversuch und waren 1 Stunde nach Belastungsende vollständig reversibel. Erneut blieb die Aufwärmphase ohne einen messbaren Einfluss.

Zur Untersuchung der Lagerungsstabilität der Konjugate wurden die aufbereiteten Proben von 5 Probanden nach der eigentlichen Messung am Durchflusszytometer weiterhin bei 4°C und Dunkelheit gelagert. Erneute Messungen erfolgten dann nach 15, 30 und 60 Minuten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 zusammengefasst. Erneut fand sich eine kontinuierliche und statistisch hochsignifikante Zunahme des Anteils an Konjugaten mit der Zeit.

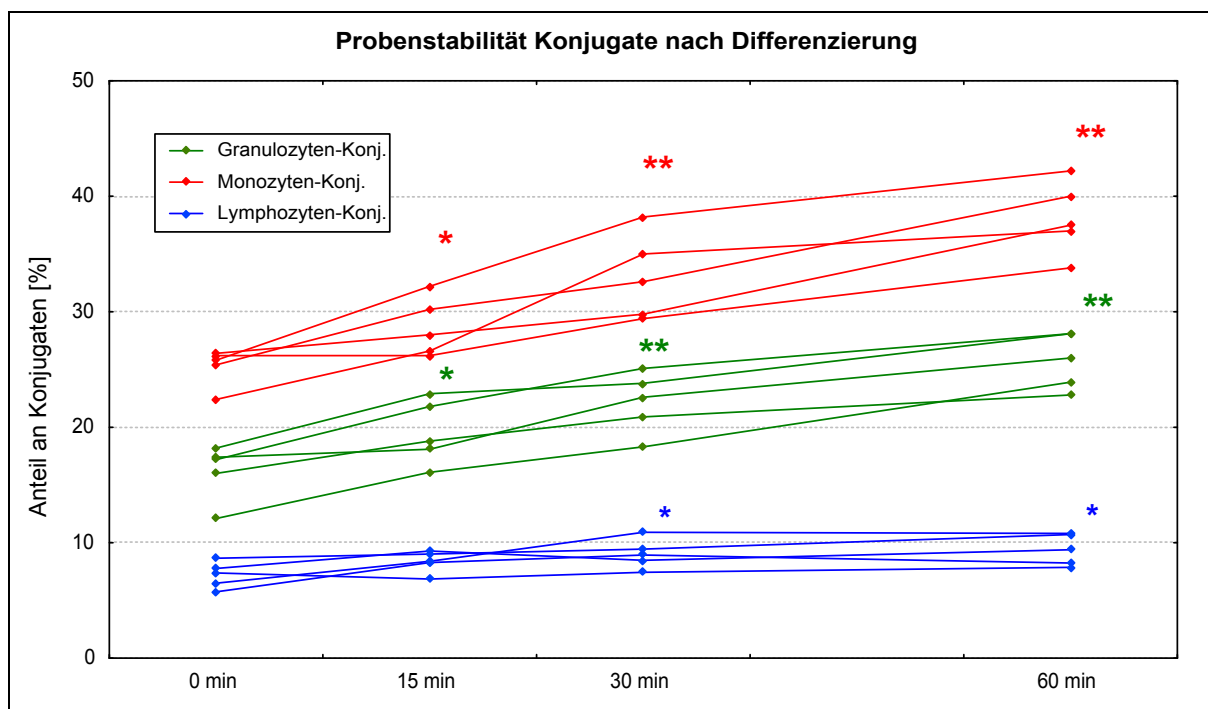


Abbildung 33: zeitliche Stabilität der Konjugate nach Differenzierung bei sofortiger Analyse und Messung der gleichen Proben nach 15, 30 und 60 Minuten; * - $p \leq 0,05$ und ** - $p \leq 0,01$ (Friedmans ANOVA)

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass in der untersuchten Probandengruppe durch eine hochintensive Kurzzeitbelastung keine direkte Zunahme der Thrombozytenaktivität (CD62P und CD63) provoziert werden konnte. Demgegenüber zeigte sich eine klare Zunahme der Konjugatbildung, die als indirekter Marker einer Thrombozytenaktivierung in vivo zu werten ist. Ebenso kam es erneut zu einem deutlichen Anstieg der Thrombozytenreaktivität.

5 Diskussion

In drei aufeinander aufbauenden Teilstudien geht die vorliegende Arbeit dem Einfluss von körperlicher Belastung auf die Funktion von Thrombozyten bei überwiegend gut trainierten Normalpersonen nach. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden jeweils die Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten nach 3 unterschiedlichen Belastungen untersucht. Während ein Teil der Methodik über den gesamten Studienablauf konstant beibehalten wurde, erfolgte gemäß dem Schwerpunkt der Arbeit studienbegleitend eine kontinuierliche Weiterentwicklung der Methodik. Dabei gelangte im Studienverlauf die Analyse von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten, als sensitiver Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo*, immer weiter in das Blickfeld der Untersuchung.

5.1 Die belastungsinduzierte Thrombozytose

Ein Anstieg der Thrombozytenzahl unter körperlicher Belastung ist langjährig bekannt (56, 260). In zahlreichen Folgeuntersuchungen wurden Zunahmen zwischen 18 und 80 % berichtet (33, 72). Für die Stufentestverfahren konnte ein Anstieg um durchschnittlich 29 % (Laufband) und 30 % (Radergometer) gefunden werden. Zwischen beiden Belastungsarten ergab sich kein signifikanter Unterschied. Nach dem Dauertest zeigte sich mit im Mittel 44 % eine deutlich stärkere Zunahme der Thrombozytenzahl, die im Gegensatz zu den Stufentests auch 2 Stunden nach Belastungsende noch nicht wieder vollständig auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt war. Demgegenüber fand sich unmittelbar nach der 90-sekündigen Maximalbelastung keine meßbare Veränderung der Thrombozytenzahl. Erst 15 Minuten nach Belastungsende stellte sich eine signifikante, wenn auch vergleichsweise geringe Zunahme um durchschnittlich 14 % ein, die binnen einer Stunde vollständig reversibel war. Auch nach dem 15-minütigen Aufwärmen vor der Kurzzeitbelastung hatte sich ein geringer aber signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahl gezeigt, obwohl die Belastungsintensität mit einer Leistung von 50 % der IAS eher als unschwellig anzusehen war.

Damit konnte nach allen untersuchten Belastungsformen eine Zunahme der Thrombozytenzahl gefunden werden. Die Ergebnisse legen dabei nahe, dass die Zunahme in erster Linie von der Belastungsdauer und erst in zweiter Linie von der Belastungsintensität abhängig ist.

Parallel zum Anstieg der Thrombozytenzahl berichten einige Autoren über eine Zunahme der Thrombozytengröße nach Belastung (42, 89, 201). Demgegenüber konnte an anderer Stelle keine Größenzunahme nach einer schweren Ausdauerbelastung gefunden werden (177). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach allen Belastungsinterventionen jeweils ein Anstieg des MPV. Dieser war mit Ausnahme von Teilstudie II statistisch signifikant.

Kritisch muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass bei der Bestimmung des MPV mit Hilfe eines Blutbildautomaten (Coulter A^C T diff.) nicht sicher zwischen großen Thrombozyten und kleinen Aggregaten unterschieden werden kann. Das Auftreten von Mikroaggregaten nach körperlicher Belastung wurde mehrfach beschrieben und kann anhand der Platelet-Aggregate-Ratio (PAR) gemessen werden (114, 149, 188, 354). Im Gegensatz zur Antikoagulation mit EDTA zeichnet sich die Messung der Plättchengröße mit der in dieser Arbeit verwendeten Antikoagulation mit Citrat durch eine hohe Probenstabilität aus (19). Als weiterer Hinweis auf eine tatsächliche Zunahme der Plättchengröße nach Belastung mag ferner gewertet werden, dass parallel zur Zunahme des MPV auch eine signifikante Zunahme des durchflusszytometrisch gemessenen Vorwärtstreulichts gefunden werden konnte (Tab. 7).

Für Patienten mit einer gesicherten Stenose der Herzkranzgefäße berichten YILMAZ et al. von einer signifikanten Zunahme des MPV nach einer stufenförmig ansteigenden Belastung. Da sich für eine gesunde Kontrollgruppe kein messbarer Anstieg zeigte, werten die Autoren ihre Beobachtung als möglichen Risikofaktor für spätere thrombembolische Ereignisse (357). Demgegenüber war in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg des MPV auch bei überdurchschnittlich gut trainierten und gesunden Normalpersonen nachweisbar.

Einige Arbeiten legen nahe, dass die Milz bevorzugt junge Thrombozyten speichert (90, 304), denen neben einem größeren Volumen auch eine stärkere Aktivität zugesprochen wird (3, 49, 50, 126, 166, 167). Diesem Konzept folgend soll die belastungsinduzierte Thrombozytose aufgrund der Freisetzung von Thrombozyten aus der Milz (42, 292) mit einem Anstieg der Zahl jüngerer und aktiverer Zellen einhergehen (89, 90). Zwar berichten auch CHAMBERLAIN et al. 1990 von einer Zunahme des MPV unter körperlicher Belastung, doch ergaben sich keine Unterschiede in der Altersverteilung zwischen zirkulierenden und in der Milz gepoolten Thrombozyten (42). Ebenso fanden auch SCHMIDT & RASMUSSEN keine vermehrte Ausschüttung von jungen Thrombozyten nach Belastung (293).

5.2 Thrombozytenaktivität und Reaktivität – methodische Aspekte

5.2.1 Methodenkritik Probenaufbereitung

Der gewählte Ablauf der Probengewinnung und Aufbereitung zielt auf eine möglichst geringe Manipulation der Proben. Damit sollte eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* auf ein Minimum reduziert werden. In Abhängigkeit der Liegedauer kann bei wiederholter Blutentnahme über einen Venenverweilkatheter eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten beobachtet werden (208, 286). Daher erfolgten alle Blutentnahmen durch jeweils frische Punktionen einer neuen Vene. Die verwendeten Kanülen besaßen einen scharfen Schliff und

einen ausreichend großen Innendurchmesser (327). Gemeinsam mit einem geringen Sog beim Füllen der Monovetten wird so einer Thrombozytenaktivierung durch auftretende Scherkräfte entgegengewirkt. Eine kontrollierte Stauung von 40 mmHg reduziert ferner eine Reaktion des Gefäßendothels, wie sie bei starker Stauung beobachtet werden kann. Aufgrund der auch bei frischer Punktion auftretenden Freisetzung von Gewebsthromboplastin und nachfolgender Thrombinbildung wurden die ersten 3 ml jeder Blutentnahme jeweils verworfen.

Entsprechend den Empfehlungen des Konsensusprotokolls zur durchflusszytometrischen Untersuchung von Thrombozyten erfolgte die Antikoagulation mit Natrium-Citrat (297). Wegen bestehender Interaktionen mit Membranproteinen und immunologischen Reaktionen kann Heparin als Antikoagulanzen nicht empfohlen werden. Ferner führt EDTA, welches standardisiert bei hämatologischen Untersuchungen Verwendung findet, aufgrund von starken Wasser und Elektrolytverschiebungen zu einer zeitabhängigen Größenveränderung der Thrombozyten (19) und einem veränderten Funktionsverhalten wichtiger Oberflächenrezeptoren (297). RITCHIE et al. verweisen auf eine signifikante Zunahme der Aktivität für CD62P unter Verwendung von EDTA (279).

Alle Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion wurden im Vollblut und damit in ihrem physiologischen Milieu durchgeführt. Neben dem pH-Wert und der Ionenverteilung wird die Thrombozytenfunktion auch entscheidend durch die Anwesenheit von Erythrozyten und Leukozyten beeinflusst (226). Die Verwendung von Vollblut sichert die Untersuchung der gesamten Thrombozytenpopulation, während es durch Präparation von plättchenreichem Plasma (PRP) regelmäßig zu einem Verlust von 30-40 % der Zellen kommt. Dabei gehen aufgrund von Größen- und Dichteigenschaften während der Zentrifugation überwiegend große und möglicherweise reaktivere Subpopulationen verloren (1, 49, 167, 302). Darüberhinaus bewirkt der Verzicht auf eine Zentrifugation und mögliche Waschschrte eine Reduktion der artifiziellen Aktivierung von Thrombozyten *in vitro* (9, 105, 110, 224, 226). Auf eine Zentrifugation oder ein Vortexen wurde während der gesamten Probenaufbereitung verzichtet.

Bei Lagerung der Thrombozyten kommt es nach erfolgter Blutentnahme regelmäßig zu einer zeitabhängigen Zunahme der Thrombozytenaktivität (135, 279, 302, 303). In dieser Arbeit wurde mit der Aufarbeitung der Proben innerhalb von 5 Minuten nach der Blutentnahme begonnen. Alle Messungen waren innerhalb von 45 Minuten nach Punktion abgeschlossen.

Vor der Färbung erfolgte für alle Proben eine Verdünnung auf 20000 Thrombozyten pro Mikroliter. Die Einstellung einer konstanten Zellkonzentration garantiert ein gleichmäßiges Verhältnis zwischen der Zellzahl und der eingesetzten Antikörpermenge. Gleichzeitig wird

durch die Verdünnung die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Zell-Zell Interaktionen vermindert und der Bildung von Thrombozytenaggregaten *ex vivo* vorgebeugt (171, 226). Die Zugabe von 0,5 % bovinem Serumalbumin in die Pufferlösung reduziert die nicht spezifische Bindung von Antikörpern (297).

Alle Untersuchungen wurden in Form einer 2-Farben-Analyse in der Kombination von CD41/CD62P bzw. CD42b/PAC-1 durchgeführt. Da sich die vergleichsweise kleinen Blutplättchen in ihren Streulichteigenschaften nicht immer sicher von Zelltrümmern oder Verunreinigungen unterscheiden lassen, kann durch die Verwendung der für Thrombozyten spezifischen CD41 bzw. CD42b Antikörper die Unterscheidung zwischen Thrombozyten und anderen Ereignissen in Vollblutproben erheblich verbessert werden (328). In eigenen Voruntersuchungen wurde die Reinheit der Gates auf mehr als 98 % spezifische Ereignisse bestimmt.

Da CD41 und CD42b eine hohe Expressionsdichte auf der Plättchenmembran aufweisen, wurden sie als Farbstoffkonjugate mit Phycoerythrin (PE, Emissionswellenlänge 568-590 nm) eingesetzt. Aufgrund ihrer geringeren Expressionsdichte wurden die Antikörper gegen die aktivierungsabhängigen Antigene P-Selektin und PAC-1 in Konjugation mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, 504-541 nm) verwendet. Mit dieser Anordnung lassen sich Probleme in der Auswertung des intensitätsschwächeren Signals für FITC aufgrund der spektralen Überlappung des Fluoreszenzlichtes in Richtung des längerwelligen Bereiches minimieren (15, 183, 225, 297). Auf eine Kombination von CD41 und PAC-1 wurde verzichtet, da beide Antikörper unterschiedliche Bindungsstellen am gleichen Membranprotein (GP IIb-IIIa) besitzen und sich möglicherweise gegenseitig behindern.

5.2.2 Auswirkungen der Fixierung

Bei der Untersuchung von Einflüssen einer Fixierung auf die durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivität ist zu beachten, dass die Aktivierung von Thrombozyten kein einzelnes Ereignis ist. Vielmehr umfaßt sie mehrere Schritte wie den Formwandel, die Aggregation oder die Sekretionsreaktion. Alle diese Teilschritte sind der durchflusszytometrischen Analyse zugänglich (8, 157, 211, 225, 287, 297, 328).

Abhängig vom Zeitpunkt der Fixierung zeigte diese Studie einen hochsignifikanten Rückgang des Vorwärtsstreulichts (FSC) von Thrombozyten (Tab. 7). Nach Fixierung mit Paraformaldehyd berichten DE CATERINA et al. von einem Rückgang des MPV (61). Solche Größenveränderungen als direkte Folgen einer chemischen Fixierung sind bereits langfristig bekannt und lassen sich mit Verschiebungen im Wasser- und Elektrolytgehalt der Zellen erklären (237). Eine Abnahme des MPV könnte eine logische Erklärung für den beobachteten Rückgang des FSC bieten. Jedoch findet sich parallel zum Rückgang des FSC auch eine

hochsignifikante Zunahme des Seitwärtsstreulichtes (SSC). Diese gegenläufigen Veränderungen machen einen einfachen Größenrückgang wenig wahrscheinlich. Vielmehr weisen sie auf einen fixierungsabhängigen Wandel in der Form der Thrombozyten hin. Ebenso konnte MORGENSTERN in einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von schockgefrorenen Thrombozyten eine artifizielle Faltung und Vesikelbildung der Membran während einer mit Hilfe von Thrombin stimulierten Sekretionsreaktion nachweisen, die nur bei gleichzeitiger Aldehydfixierung beobachtet werden konnte (236).

P-Selektin (CD62P), aufgrund seiner Molekülmasse von 140 000 Dalton auch als GMP-140 oder PADGEM (platelet activation dependent granule-external membrane protein) bekannt, ist ein membranständiger Adhäsionsrezeptor, der in den α -Granula ruhender Thrombozyten lokalisiert ist. Eine Expression von P-Selektin auf der Oberfläche von Thrombozyten erfolgt erst nach aktivierungsabhängiger Sekretion der α -Granula durch Membranverschmelzung (146, 213, 310). Sowohl in der Auswertung nach % positiven Zellen als auch in der MFI für CD62P fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unfixierten und den nachträglich fixierten Proben (Abb. 17). In Ruhe zeigte sich für beide Ansätze mit durchschnittlich 0,9 bzw. 0,8 % CD62P positiven Zellen eine insgesamt sehr geringe Aktivierung der Thrombozyten. Ähnlich niedrige Werte waren zuvor schon von SHATTIL et al. 1987 beschrieben worden (302). Auch HU et al. fanden bei unfixierten Thrombozyten ein vergleichbar geringes Aktivitätsniveau von durchschnittlich 1,1 % CD62P positiven Zellen. Trotz des geringen Aktivierungsniveaus berichteten die Autoren von einer weiteren, signifikanten Reduktion der CD62P Expression auf Thrombozyten, wenn diese nach erfolgter Fluoreszenzfärbung anschließend mit Paraformaldehyd in Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 % fixiert worden waren (147). Ein solcher Unterschied ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Da sich beide Ansätze auch nicht von dem Leerwert der Negativkontrolle unterschieden, ist davon auszugehen, dass die gewählte Methode der Probenaufbereitung zu keiner messbaren Aktivierung von ruhenden Thrombozyten für CD62P führte.

Demgegenüber führte die direkte Fixierung der Thrombozyten vor der Immunfärbung zu einer leichten Zunahme von CD62P, die sich in der Auswertung der MFI gegenüber den beiden anderen Ansätzen und der Negativkontrolle jeweils als hochsignifikant erwies. Die jeweiligen Intraklassenkorrelationskoeffizienten von $R=0,14$ (vs. unfixiert) und $R=0,28$ (vs. nachträglich fixiert; jeweils $p \leq 0,001$) belegen die kaum gegebene Vergleichbarkeit der Messergebnisse nach direkter Fixierung gegenüber den anderen Probenansätzen.

Wie für die ruhenden Thrombozyten, so fand sich auch nach Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 kein Unterschied in der Expression von P-Selektin zwischen unfixierten und nachträglich

fixierten Thrombozyten (Abb. 20). Dies ist in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen, wie sie zuvor von anderen Autoren für eine Stimulation mit ADP (147) oder Phorbol-Ester (302) berichtet worden sind. Bei Aktivitätsunterschieden zwischen 20 und 80 % aktivierter Thrombozyten nach Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 ergab sich in der Intraklassenkorrelation mit $R=0,86$ ($p \leq 0,001$) eine sehr gute Vergleichbarkeit beider Ansätze. Angesichts nur geringer Veränderungen durch nachträgliche Fixierung mit Paraformaldehyd gilt CD62P als geeigneter Marker zur Untersuchung der Thrombozytenaktivität in unfixierten und nachträglich fixierten Proben (116, 135, 147, 279). Hingegen wird für Thrombozyten, die nach *in vitro* Stimulation zunächst fixiert und erst dann gefärbt worden sind, wiederholt über eine reduzierte Anbindung von aktivierungsabhängigen Antikörpern berichtet (220, 302).

Der eingesetzte monoklonale CD41 Antikörper (Klon P2) erkennt die α IIB-Untereinheit des intakten Glycoprotein IIB-IIIa Komplexes, der nur auf der Oberfläche von Thrombozyten und thrombozytären Vorläuferzellen exprimiert ist (222, 226, 297). Durch nachträgliche Fixierung mit 0,5 % Paraformaldehyd kam es für ruhende Thrombozyten zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg der MFI für CD41-PE gegenüber der unfixierten Probe (Abb. 16). Dennoch verweist ein Interklassenvariationskoeffizient von $R=0,79$ auf eine gute Vergleichbarkeit der Messergebnisse beider Ansätze ($p \leq 0,001$). Demgegenüber führte die direkte Fixierung nahezu zu einer Verdopplung der Oberflächenexpression des GP IIB-IIIa Rezeptors. Mit Variationskoeffizienten von $R=0,08$ bzw. $R=0,09$ ist die Vergleichbarkeit gegenüber den anderen Ansätzen vollständig aufgehoben. Ein ähnlicher Anstieg der GP IIB-IIIa Expression wurde von GEORGE et al. nach einer Stimulation mit Thrombin berichtet (105). Diese Zunahme ist das Ergebnis einer Umverteilung von GP IIB-IIIa Rezeptoren aus intrazellulären Speichern im Zuge der Aktivierungsreaktion (237). Verglichen mit den Stimulationsversuchen in dieser Arbeit, lag die MFI von CD41-PE nach direkter Fixierung von ruhenden Thrombozyten in etwa auf dem Niveau der Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 (Abb. 16 u. 20).

Im Rahmen einer Aktivierungsreaktion stellt sich eine Konformationsänderung im GP IIB-IIIa Rezeptorkomplex mit nachfolgender Ausbildung einer neuen Bindungsstelle für Fibrinogen ein (259). Die Öffnung dieser Bindungsstelle ist die physiologische Grundlage für eine Aggregation der Thrombozyten (288). Der monoklonale PAC-1 Antikörper richtet sich gegen diese neue Bindungsstelle und bindet daher nur an aktivierte Thrombozyten (301). Bereits in Ruhe fand sich eine mäßige, aber hochsignifikante Zunahme der PAC-1 Aktivität von ca. 1,8 % positiven Zellen (unfixiert) auf etwa 3,2 % bei nachträglicher Fixierung. Ähnlich einer moderaten Stimulation stieg nach der Stufentestbelastung auf dem Laufband der Anteil aktivierter Thrombozyten bei nachträglicher Fixierung auf durchschnittlich 5,1 % gegenüber

2,2 % in den unfixierten Proben (Abb. 18). Bei einer Interklassenkorrelation zwischen beiden Ansätzen von $R=0,42$ ergibt sich allenfalls noch eine mäßige Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Demgegenüber provoziert die direkte Fixierung eine mehr als 10-fache Zunahme der Bindung von PAC-1 und hebt jede Vergleichbarkeit gegenüber den anderen Ansätzen auf.

Diese Ergebnisse finden ihre Bestätigung in einer Arbeit von HEZARD et al., in der eine gesteigerte Bindung von PAC-1 und Fibrinogen nach Fixierung der Thrombozyten mit Paraformaldehyd beschrieben wird (135). Ebenso berichten auch SHIMIZU et al. nach Fixierung ruhender Thrombozyten mit Formaldehyd über einen Anteil von etwa 15 % PAC-1 positiver Zellen (303). Der fixierungsbedingte Anstieg in der Aktivität von PAC-1 war in der vorliegenden Arbeit auch dann noch signifikant nachweisbar, wenn die Thrombozyten zuvor mit 10 μ M ADP stimuliert worden waren (Abb. 21).

Im Vergleich zu CD62P zeigten ruhende Thrombozyten ein insgesamt höheres Aktivitätsniveau für PAC-1. Dies war nicht unerwartet, da gezeigt werden konnte, dass selbst die Zugabe von Iloprost, einem synthetischen Prostacyclin-Analogon und potenten Thrombozyteninhibitor, einen frühzeitigen Anstieg der Thrombozytenaktivität für PAC-1 nicht aufhalten kann (303). Eine Zunahme der PAC-1 Aktivität bei fehlender Expression von CD62P stellt indes keinen Widerspruch dar. Nach Stimulation mit einem schwachen Agonisten ist eine kräftige Zunahme von PAC-1 beschrieben, während gleichzeitig nur eine geringe Expression neuer Oberflächenrezeptoren als Folge einer Sekretionsreaktion zu beobachten war (301). Aufgrund ähnlicher Ergebnisse schlossen RUF & PATSCHEKE (287) sowie JANES et al. (157), dass die Öffnung der Fibrinogenbindungsstelle einem frühen Stadium der Thrombozytenaktivierung entspricht. Ebenso berichteten auch AULT et al. (8) über CD62P negative Thrombozyten, die sich unabhängig davon an der Bildung von Aggregaten beteiligten.

Der eingesetzte monoklonale CD42b Antikörper (Klon SZ2) erkennt die $Ib\alpha$ -Untereinheit des GP Ib-V-IX Rezeptors. Auch dieser Rezeptor zeigt ein aktivierungsabhängiges Expressionsverhalten, welches sich von den anderen Membranrezeptoren dahingehend unterscheidet, dass es mit der Aktivierung zu einem Rückgang der Oberflächenexpression kommt (105, 217, 218). Dieser Rückgang ist die Folge einer Umverteilung des Rezeptorkomplexes in die Membranen des oberflächenverbunden Kanälchensystems (145) und erfolgt unabhängig von der Sekretionsreaktion der α -Granula (218). In der vorliegenden Arbeit führte die direkte Fixierung der Thrombozyten zu einem hochsignifikanten Rückgang der MFI von CD42b-PE gegenüber der unfixierten Verarbeitung (Abb. 16). Gleichzeitig fand sich jedoch ein geringer aber signifikanter Anstieg der MFI von CD42b-PE bei nachträglicher Fixierung. Dieser vordergründige Widerspruch kann durch die Beobachtung aufgelöst werden, dass der durch-

flusszytometrische Nachweis des Rückgangs der Oberflächenexpression von GP Ib-V-IX sowohl von der Art der Fluoreszenzmarkierung (109) als auch vom Zeitpunkt der Antikörperinkubation (219) abhängig ist. Wird die Fluoreszenzmarkierung von GP Ib-V-IX erst dann durchgeführt, wenn die aktivierungsabhängige Umverteilung in das Zellinnere bereits erfolgt ist, können nur noch die auf der Oberfläche verbliebenen Rezeptoren markiert werden. Da ein selbständiges Eindringen der Antikörper in das oberflächenverbundene Kanälchensystem nicht möglich ist, kann mit dieser Methodik die Oberflächenabnahme von GP Ib-V-IX gemessen werden. Erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten jedoch erst nach Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper, so werden die GP Ib-V-IX Rezeptorkomplexe einschließlich der ihnen bereits anhaftenden Antikörper internalisiert. In diesem Fall ist die Umverteilung von GP Ib-V-IX nicht messbar, da durchflusszytometrisch nicht zwischen oberflächengebundenem und internalisiertem Farbstoff unterschieden werden kann.

Betrachtet man die fixierungsabhängigen Einflüsse auf die vier untersuchten Antikörper zusammenfassend, so wird rasch deutlich, dass die gefundenen Veränderungen nicht allein über unspezifische Effekte der Fixierung, eine veränderte Autofluoreszenz der Thrombozyten oder einen fixierungsabhängigen Verlust bestimmter Epitope (297) erklärt werden können. In Folge der direkten Fixierung der Thrombozyten mit Paraformaldehyd kam es zu einem Formwandel der Thrombozyten sowie jeweils signifikanten Anstiegen von CD41, CD62P und PAC-1. Angesichts des gleichzeitigen Rückganges von CD42b muss gefolgert werden, dass die direkte Fixierung mit Paraformaldehyd eine systematische Aktivierung der Thrombozyten provoziert. Erfolgt die Fixierung erst nach der Antikörperinkubation treten die beobachteten Veränderungen in deutlich geringerem Ausmaß zu Tage, bleiben aber mit Ausnahme von CD42b angesichts der oben diskutierten Ursachen weiterhin nachweisbar.

Unter Verwendung von CD62P als einzigem Aktivierungsmarker wären diese systematischen Veränderungen leicht übersehen worden. Bei nachträglicher Fixierung zeigte sich sowohl für ruhende als auch für TRAP-6 stimulierte Thrombozyten kein messbarer Unterschied in der Expression von CD62P. Auch in der direkten Fixierung wird nur ein geringer Stimulations-effekt auf CD62P sichtbar, der für die ruhenden Thrombozyten zwar zu einem signifikanten Anstieg der MFI führt, aber nicht ausreicht, um in der Auswertung nach % positiven Zellen einen signifikanten Unterschied zu provozieren.

5.2.3 Probenstabilität

Nach einer Fixierung mit Paraformaldehyd und anschließendem Waschen der Thrombozyten fanden AULT et al., dass die Oberflächenexpression von P-Selectin über 48 Stunden stabilisiert werden kann (8). Auch an anderer Stelle wird von einer 24-stündigen Stabilität der P-

Selektin Expression berichtet, wenn zuvor aktivierte Thrombozyten zunächst fixiert und dann bei 4 °C und in Dunkelheit gelagert werden (8, 105, 171). Hingegen konnte für die Lagerung von TRAP-6 stimulierten Vollblutproben bei Raumtemperatur gezeigt werden, dass es trotz einer Fixierung mit Paraformaldehyd binnen weniger Stunden zu einem signifikanten Verlust des P-Selektins von der Thrombozytenoberfläche kommt (296). HU et al. untersuchten die Lagerungsstabilität ruhender und ADP stimulierter Thrombozyten im Vollblut nach Fixierung mit Formaldehyd oder Paraformaldehyd für eine Lagerung bei 4°C und in Dunkelheit. Dabei erwies sich sowohl die Oberflächenexpression von CD62P als auch die Bindung von Fibrinogen für eine Dauer von 6 Stunden als stabil, nicht aber darüber hinaus (147). Die Autoren berichteten ferner, dass auch für unfixierte Vollblutproben innerhalb der ersten 2 Stunden keine signifikanten Veränderungen gefunden werden konnten. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit, in der sich nach Lagerung der unfixierten Proben bei 4°C und in Dunkelheit in der Auswertung nach % CD62P positiven Zellen über einen Beobachtungszeitraum von 1 Stunde keine signifikanten Veränderungen ergaben. Die Stabilität war unabhängig davon, ob ruhende Thrombozyten untersucht wurden oder ob die Proben zuvor mit ADP oder TRAP-6 stimuliert worden waren (Abb. 22 u. 23).

Ein anderes Bild ergab sich für die Auswertung der Thrombozytenaktivität nach Prozent PAC-1 positiven Zellen. Während ruhende und unfixierte Thrombozyten für eine Stunde ihr konstant niedriges Aktivierungsniveau beibehielten, kam es durch die Fixierung bereits nach 15 Minuten zu einem hochsignifikanten Anstieg des Anteils an PAC-1 positiven Thrombozyten, der sich auch in der weiteren Beobachtung kontinuierlich fortsetzte (Abb. 22). Dieser Anstieg unterstreicht, wie bereits oben diskutiert, die stimulierende Wirkung von Paraformaldehyd auf die PAC-1 Aktivität von Thrombozyten.

Diese eigenen Untersuchungen zur Probenstabilität belegen, dass die durchflusszytometrische Untersuchung der Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten auch ohne Fixierung erfolgen kann. Bereits SHATTIL et al. hatten darauf hingewiesen, dass eine unfixierte Messung möglich ist, wenn mit der Probenaufbereitung binnen 10 Minuten nach der Blutabnahme begonnen und die Analyse der Proben innerhalb von 2 Stunden abgeschlossen wird (302). In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Aufarbeitung der Proben innerhalb von 5 Minuten nach der Blutentnahme begonnen. Alle Messungen waren innerhalb von 45 Minuten abgeschlossen. Mit dem Argument einer möglichst minimalen Probenmanipulation unterstützen auch GOODALL & APPLEBY die unfixierte Analyse von Thrombozyten (110).

Neben den Einflüssen einer Fixierung und der Lagerungsstabilität stellt sich ferner die Frage, in wie weit die gewählte Art der Immunfluoreszenzmarkierung auch selbst die gemessene

Thrombozytenaktivität beeinflusst. Da auf den Einsatz der Antikörper kaum verzichtet werden kann, lässt sich der Einfluss der Markierungsmethode nur indirekt erschließen. Einen ersten Hinweis erhält man durch den Vergleich der gemessenen Aktivität mit den Ergebnissen der Negativkontrolle. Für die ruhenden Thrombozyten fand sich sowohl bei unfixierten Verarbeitung als auch bei nachträglicher Fixierung kein signifikanter Unterschied in der CD62P Expression gegenüber der Negativkontrolle. Entsprechend darf geschlussfolgert werden, dass durch die gewählte Methode der Immunfärbung keine Sekretionsreaktion der Thrombozyten hervorgerufen wurde. Im Gegensatz dazu lag die Aktivität für PAC-1 signifikant über den Leerwerten der Negativkontrolle. Dies entspricht der bereits diskutierten insgesamt höheren Aktivität und anfälligeren Aktivierbarkeit für PAC-1.

Ein zweiter indirekter Hinweis kann dadurch gewonnen werden, dass die Thrombozyten zunächst für einige Zeit im Wärmebad belassen werden und erst dann gefärbt werden. Im Vergleich der CD62P Expression zwischen unmittelbar gefärbt und zunächst für 10 Minuten im Wärmebad belassenen Thrombozyten fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19). Damit erwies sich die Analyse von P-Selektin erneut als wenig anfällig für äußere Einflüsse durch die Probenaufbereitung. Demgegenüber resultierte der verlängerte Aufenthalt im Wärmebad in einem signifikanten Anstieg für PAC-1. Dieser muss bei fehlender CD62P Expression im Sinne einer Teilaktivierung der Thrombozyten gewertet werden. Entsprechend darf für die Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten im Wärmebad ein leicht aktivierender Effekt angenommen werden. Das Ausmaß der stimulierenden Wirkung kann nur geschätzt werden. Bei fehlender CD62P Expression der ruhenden Thrombozyten gegenüber der Negativkontrolle und durchschnittlich 1,8 % PAC-1 positiven Thrombozyten bei unfixierter Verarbeitung darf von einer minimalen Aktivierung ausgegangen werden. Dennoch machen die Ergebnisse deutlich, wie wichtig es ist, die Aufbereitung der Proben unmittelbar nach der Blutentnahme zu beginnen und möglichst schnell abzuschließen.

Der Einsatz des Wärmebades besitzt den Vorteil, dass die Thrombozyten weiterhin bei physiologischen 37 °C Körpertemperatur gehalten werden und entsprechend den Untersuchungen von KOKSCH bereits nach 5 Minuten eine vollständige Antikörperbindung erreicht werden kann (181, 183). Demgegenüber ist für die Inkubation bei Raumtemperatur meist eine Inkubationszeit von 15 Minuten notwendig (297).

Mit der Einführung eines Isotyp-Antikörpers als Negativkontrolle ab Teilstudie II konnte die Aufbereitungszeit um weitere 5 Minuten reduziert und damit einer artifiziellen Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* weiter vorgebeugt werden. Dennoch zeigte sich in Ruhe mit durchschnittlich 1,6 % (Dauertest) und 1,8 % (90-Sekunden Test) aktivierten Thrombozyten

ein gegenüber den Stufentestversuchen mit im Mittel 0,8 % positiven Zellen merklich höheres Aktivitätsniveau. Angesichts der um 5 Minuten verkürzten aber sonst vollständig identischen Probenaufbereitung erscheint eine tatsächliche Steigerung der Thrombozytenaktivität eher unwahrscheinlich. Als Erklärungsalternative konnte in eigenen Voruntersuchungen gefunden werden, dass trotz eines nach Herstellerangaben identischen Protein-Farbstoff Verhältnisses bei der Färbung ruhender Thrombozyten die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Isotyp-Antikörpers gegenüber der Färbung mit CD62P-FITC um ca. 25 % niedriger ausfällt. Für die Auswertung nach % positiven Zellen folgt daraus, dass bei Verwendung des Isotyp-Antikörpers die Festlegung des Schwellenwertes, ab dem eine Zelle als positiv eingestuft wird, gegenüber einer Negativkontrolle durch Blockade der spezifischen Bindung, wie sie in der ersten Teilstudie durchgeführt worden war, eine geringe Linksverschiebung erfährt. In Folge werden dann insgesamt etwas mehr positive Ereignisse gezählt. Gegen eine Zunahme der Thrombozytenaktivität *in vitro* spricht ferner, dass die gemessene Aktivität immer noch deutlich unter dem Niveau liegt, welches von anderen Autoren für die CD62P Aktivität von unstimulierten Thrombozyten nach Fixierung berichtet wird (211, 234, 281, 287).

In der Zusammenschau der Ergebnisse aus Teilstudie I muss darüber hinaus festgehalten werden, dass PAC-1 eine erheblich größere Anfälligkeit für eine artifizielle Aktivierung *in vitro* besitzt als CD62P. Ferner konnte im Gegensatz zu CD41 in keinem der untersuchten Ansätze ein Einfluss der Belastungsintervention auf das Expressionsverhalten von CD42b gefunden werden. Angesichts dieser umfangreichen Daten fiel daher die Entscheidung, die Analyse der Thrombozytenaktivität und -reaktivität in den folgenden Teilstudien auf die Untersuchung von CD41 und CD62P zu beschränken.

5.2.4 Stimulationsversuche

Für die Stimulationsversuche in Teilstudie I ergab sich ein unterschiedliches Ansprechen der Aktivierungsmarker CD62P und PAC-1 (Tab. 9). Während die Stimulation mit ADP durch eine Aktivierung des GP IIb-IIIa Rezeptors überwiegend die Bindungskapazität für PAC-1 erhöhte und einen allenfalls geringen Einfluss auf die CD62P Expression zeigte, führte die Stimulation mit TRAP-6 vor allem zu einer Aktivierung der Sekretionsreaktion mit der Folge einer deutlichen Steigerung der Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P).

Trotz unterschiedlichen Stimulationserfolges zeigten alle Stimulationsversuche eine gleichsinnige Zunahme der Thrombozytenreaktivität nach den Stufentestbelastungen. Dabei ergaben sich die stärksten Zunahmen der Reaktivität nach Belastung immer dann, wenn insgesamt nur ein geringes oder mittleres Stimulationsniveau erreicht wurde. Bei zu starker Stimulation mit einem Anteil von 70 % PAC-1 positiven Zellen, wie nach der Stimulation mit

10 μM ADP, wurde der Einfluss der Belastungsintervention durch die Intensität der Stimulation überlagert.

Zwar konnte in der Auswertung der CD62P Aktivität nach Stimulation mit TRAP-6 sowohl für den Laufband- als auch für den Fahrradstufentest eine signifikante Reaktivitätszunahme nachgewiesen werden, doch fand sich auch hier für einzelne Probanden mit bis zu 80 % aktivierten Thrombozyten eine sehr hohe Stimulationswirkung (Abb. 20). Die ab Teilstudie II vorgenommene Reduktion der Endkonzentration für TRAP-6 von 10 μM auf 7,5 μM wirkte sich dahingehend positiv aus, dass nun bei einem mittleren Stimulationsniveau von ca. 35 % aktivierten Thrombozyten auch für einzelne Probanden kaum noch Aktivitätswerte über 60 % CD62P positive Zellen gefunden werden konnten.

5.2.5 Reliabilität

Hinsichtlich der Reliabilität ergaben sich in der Auswertung nach Prozent CD62P positiven Zellen keine Unterschiede zwischen der fixierten und der unfixierten Verarbeitung (Tab. 3). Für ruhende Thrombozyten wurde eine Intertestvariabilität von jeweils 20 % bestimmt. Die vergleichsweise große Variabilität ergibt sich nicht unerwartet, da bei einem mittleren Anteil von weniger als 1 % CD62P positiven Zellen in den unstimulierten Proben, bereits minimale Veränderungen zu einem großen Variationskoeffizienten führen. Ebenso fanden RITCHIE et al. eine Intertestvariabilität von bis zu 21 % in der durchflusszytometrischen Analyse der CD62P Expression ruhender Thrombozyten (279) und HU et al. berichten für unstimulierte Thrombozyten von einer Variabilität zwischen 10 und 20 %, während nach Stimulation eine Variabilität zwischen 2 und 5 % beobachtet wurde (147). Nach Stimulation mit TRAP-6 lag die Intertestvariabilität in dieser Arbeit bei 5 % (Tab. 3). In der Berechnung der Variabilität für die Aktivitätsmessung mit PAC-1 für ruhende und stimulierte Thrombozyten ergaben sich jeweils Variationskoeffizienten zwischen 10 und 15 %. Dies entspricht sehr gut der Intertestvariabilität von 10 bis 12 %, wie sie von anderen Autoren für die durchflußzytometrische Messung der Fibrinogenbindung von Thrombozyten beschrieben wird (147).

5.3 Thrombozytenaktivität und Reaktivität – körperliche Belastung

Ausgehend von den widersprüchlichen Ergebnissen älterer Untersuchungen zum Einfluß von körperlicher Belastung auf die Thrombozytenfunktion nahm die erste Teilstudie ihren Ausgangspunkt von der Beobachtung, dass KESTIN et al. nach einer Stufentestbelastung mit Hilfe der Durchflusszytometrie nur bei Untrainierten eine Zunahme der Thrombozytenaktivität und Reaktivität finden konnten, während für Trainierten bei gleicher Versuchsanordnung keine Veränderungen meßbar waren (170). Demgegenüber beschrieben MÖCKEL et al. auch für gut

trainierte Triathleten eine signifikante Zunahme der Plättchenaktivität nach einer ebenfalls stufenförmig ansteigenden Belastung (233) und es wurde die Frage aufgeworfen, ob die unterschiedlichen Arten der Probenaufbereitung als Ursache der gefundenen Unterschiede verantwortlich gemacht werden können.

In Teilstudie I wurde die Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten nach je einem Laufband- und Fahrradstufentest sowie einem Kontrollversuch an einer Gruppe überwiegend gut bis sehr gut trainierter junger Männer untersucht. In Parallelmessungen von unfixierten, sowie nachträglich und direkt fixierten Proben während des Laufbandtests sollte zusätzlich dem Einfluß der Probenaufbereitung auf das Messergebnis nachgegangen werden. Dabei zeigte sich für den Laufbandtest in der Auswertung der CD62P Aktivität sowohl bei unfixierter als auch bei nachträglich fixierter Verarbeitung jeweils ein geringer aber signifikanter Anstieg der Thrombozytenaktivität nach Belastung (Abb. 17). Demgegenüber war nach direkter Fixierung bei insgesamt leicht gesteigertem Aktivitätsniveau der Belastungseinfluß nicht mehr nachweisbar. Nach dem Fahrradstufentest (nachträglich fixiert) ergab sich zwar ebenfalls ein moderater Anstieg des Anteils CD62P positiver Zellen, doch wurde hier das gesetzte Signifikanzniveau knapp verfehlt (Abb. 19).

In der Auswertung von PAC-1 ergab sich nach dem Laufbandtest jeweils eine signifikante Zunahme der Aktivität von durchschnittlich 1,8 % auf 2,2 % PAC-1 positiven Zellen bei unfixierter Verarbeitung und von 3,3 % auf 5,1 % bei nachträglicher Fixierung (Abb. 18). Auch nach der Fahrradergometrie zeigte sich eine Zunahme von 2,9 auf 4,8 positive Zellen ($p \leq 0,05$; ebenfalls nachträglich fixiert; Abb. 19). Damit konnte in der Auswertung von PAC-1 zwar nach beiden Testverfahren eine Zunahme der Thrombozytenaktivität gefunden werden, doch verwiesen die bei nachträglicher Fixierung gegenüber der unfixierten Messung hoch signifikant erhöhten Aktivitätswerte auf die bereits diskutierte stimulierende Wirkung der Fixierung auf die PAC-1 Expression. Damit spiegelte die Auswertung der PAC-1 Aktivität bei nachträglicher Fixierung nicht die reine Thrombozytenaktivität als viel mehr die Reaktivität der Thrombozyten im Sinne einer moderaten Stimulation wieder.

Insgesamt blieben die gemessenen Thrombozytenaktivitäten auf sehr niedrigem Niveau. Bei unfixierter Verarbeitung konnte selbst nach Ende des Laufbandtests nur eine durchschnittliche Gesamtaktivität von 1,5 % CD62P bzw. 2,2 % PAC-1 positiven Zellen gemessen werden. In der oben genannten Arbeit von MÖCKEL et al. wurden zunächst fixierte und dann gefärbte Thrombozyten untersucht (233). Die Autoren beobachteten dabei einen Anstieg von 2,2 % CD62P positiven Zellen vor auf 3,2 % unmittelbar nach Belastung. Neben der durchgeführten Fixierung muss ferner angeführt werden, dass die Blutentnahmen jeweils über einen Venen-

verweilkatheter erfolgten, dessen aktivierender Einfluss bekannt ist (208, 286). Während eines Stufentestes bei männlichen Nichtraucher der dritten Lebensdekade fanden LI et al. einen vergleichbaren Anstieg von durchschnittlich 1,1 auf 1,9 % CD62P positive Zellen (197). Ein direkter Vergleich mit den von KESTIN et al. berichteten Werten ist nicht möglich, da hier die Auswertung anhand der mittleren Fluoreszenzintensität erfolgte (170).

Ebenfalls nach einem Stufentest konnten WALLEN et al. gegenüber einem Kontrollversuch bei mäßig trainierten Normalpersonen keine gesteigerte Thrombozytenaktivität nachweisen, fanden aber eine signifikant gesteigerte Reaktivität der Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin (335). In guter Übereinstimmung dazu zeigte sich auch in den Stufentests der ersten Teilstudie für Trainierte eine eindeutige Zunahme der Reaktivität für CD62P und PAC-1 nach Stimulation mit TRAP-6 und ADP sowie für CD41 nach Stimulation mit TRAP-6 (Tab. 9 u. Abb. 20). Bei sehr hoher Stimulation mit über 60 % aktivierten Thrombozyten verlor sich der messbare Einfluss der Belastungsintervention hingegen. Bei identischer Methodik fanden HILBERG et al. in einer Untersuchung an Typ I Diabetikern und einer untrainierten Kontrollgruppe zwar ebenfalls eine Zunahme der Reaktivität aber keine Veränderung der Thrombozytenaktivität (CD62P, unstimuliert) nach einem Stufentest (137).

Für die Stufentestverfahren kann zusammenfassend festgehalten werden, dass unabhängig vom Trainingszustand die überwiegende Mehrzahl der Studien eine Zunahme der Reaktivität berichtet. Die direkte Suche nach aktivierten Thrombozyten in der Zirkulation zeigte meist nur geringe Veränderungen, die nicht immer das gesetzte Signifikanzniveau erreichten (72, 74). Die durchgeführten Parallelmessungen während des Stufentests belegen eine Abhängigkeit der Messergebnisse von der Art der Probenaufbereitung. Aufgrund der fehlenden Reaktivitätszunahme bei starker Stimulation darf geschlossen werden, dass sich Unterschiede in der Reaktivität nur bei moderater Stimulation auswirken und eine Zunahme der Gesamtzahl aktivierbarer Thrombozyten nach Belastung nicht erfolgt.

Für Belastungen mit konstanter Intensität beschrieb WANG in einer Übersichtsarbeit einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und der Belastungsintensität (344). Demnach sollen Intensitäten unter 50 % der VO_{2max} ohne Einfluss auf die Thrombozytenfunktion bleiben, während bei moderaten Belastungen zwischen 50 und 60 % der VO_{2max} eine Abnahme und bei intensiven Belastungen über 80 % der VO_{2max} eine Zunahme der Reaktivität beobachtet werden kann (342, 343).

Demgegenüber fanden IKARUGI et al. keine Abnahme der Thrombozytenfunktion nach einer moderaten Belastung (150, 152). Ebenso berichteten auch HILBERG et al. für untrainierte Normalpersonen sowohl nach einer moderaten Dauerbelastung (80 % IAS, 60 Minuten –

entspr. 57 % VO₂max) als auch nach einer intensiven Dauerbelastung (100 % IAS, mind. 45 Minuten – entspr. 69 % VO₂max) jeweils von einer Zunahme der Reaktivität (139).

Teilstudie II untersuchte eine Dauerbelastung von mindestens 60 und maximal 120 Minuten bei einer Intensität von 90 % der IAS an überwiegend gut Trainierten. Auch hier zeigte sich eine geringe aber signifikante Zunahme der Thrombozytenreaktivität (Abb. 25). Bei einer Belastungsintensität von ebenfalls 90 % IAS und einer Testdauer von 45 Minuten konnte hingegen bei Typ I Diabetikern und einer gesunden Kontrollgruppe keine Veränderung der Thrombozytenreaktivität gefunden werden (137). Allerdings muss angemerkt werden, dass in der letztgenannten Studie mit durchschnittlich 65 % CD62P positiven Zellen nach Stimulation wahrscheinlich ein zu hohes Stimulationsniveau erreicht wurde. Weder in Teilstudie II (Abb. 24) noch in einer der anderen genannten Studien fand sich eine direkte Zunahme der Aktivität unstimulierter Thrombozyten.

Demgegenüber beschrieben MÖCKEL et al. bei leistungsorientierten Sportlern nach einem Triathlonwettkampf über die olympische Distanz eine Steigerung der direkten CD62P Aktivität von 2,3 auf 3,4 % positive Zellen. Die Proben wurden direkt nach Blutentnahme fixiert und eine Stimulation zur Reaktivitätsmessung wurde nicht durchgeführt (234).

In der vorliegenden dritten Teilstudie wurde der Einfluss einer maximalen Kurzzeitbelastung (90 Sekunden; all out) auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Auch hier ergab sich nach Stimulation mit 7,5 µM TRAP-6 ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Reaktivität (Abb 30). Eine direkte Zunahme der Aktivität von Thrombozyten gemessen an der CD62P und CD41 Expression ohne Stimulation konnte erneut nicht gefunden werden.

Mit dem monoklonalen CD63 Antikörper fand in Teilstudie III ein weiterer thrombozytärer Aktivierungsmarker Verwendung. Das CD63 Antigen besitzt ein Molekulargewicht von ca. 53 000 Dalton und wurde erstmalig in den Granula ruhender Thrombozyten nachgewiesen. Nach Stimulation mit Thrombin steigt die Oberflächenexpression von ca. 650 Molekülen in Ruhe auf über 12000 durch Umverteilung über das oberflächenverbundene Kanälchensystem (scs – surface-connected canicular system) und Sekretion von Granula an (245). Das CD63 Antigen ist Teil einer Familie von integralen Membranproteinen mit je 4 transmembranösen Domänen (Tetraspanine). Es wurde später als Granulophysin identifiziert und ist Bestandteil der Membranen von dichten Granula und Lysosomen (107, 216, 300).

Die Physiologie der Oberflächenexpression von CD63 unterscheidet sich wesentlich vom Verhalten der Expression von P-Selektin und kann daher als eigenständiger und unabhängiger Aktivierungsmarker angesehen werden. So beschreiben NIEUWENHUIS et al. einen Anstieg des Anteils an CD63 positiven Thrombozyten von 5,5 % auf 24,5 % nach cardiochirurgischen

Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (245), während von anderen Autoren für vergleichbare Eingriffe ein Rückgang CD62P positiver Thrombozyten berichtet wurde (30, 122, 171, 334). Ebenso fanden auch SCHULTHEISS et al. für Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt einen signifikant erhöhten Anteil von etwa 18,7 % CD63 positiven Thrombozyten gegenüber 4,6 % in einer gesunden Kontrollgruppe. Gleichzeitig hatten sich nur geringfügige Veränderungen in der CD62P Expression ergeben. Interessanterweise war die Zunahme der CD63 Expression auch 22 Stunden nach dem Eintritt des akuten Ereignisses noch nachweisbar gewesen (298). Bei gleichzeitiger Messung von CD62P und CD63 liegt der Anteil an CD63 positiver Zellen meist etwas über dem vergleichbaren Anteil für CD62P (298, 325). Teilstudie III bestätigte diese Beobachtung mit einem mittleren Anteil von 4,5 % CD63 positiven Zellen gegenüber etwa 2,0 % CD62P positiven Thrombozyten.

Ungeachtet der Funktion als eigenständigem Aktivierungsmarker konnte wie auch schon in der Auswertung der CD62P Aktivität nach der hochintensiven Kurzzeitbelastung keine signifikante Zunahme der Thrombozytenaktivität für CD63 gegenüber den Ausgangswerten in Ruhe und dem Werteverlauf im Kontrollversuch gemessen werden (Abb. 30).

Aus methodenkritischer Sicht verdient an dieser Stelle die fehlende bzw. allenfalls geringe Zunahme der Thrombozytenaktivität nach Belastung besondere Aufmerksamkeit. Bereits 1980 postulierten HABER et al. aufgrund des Auftretens von reversiblen Thrombozytenaggregaten *in vivo* bei Belastungen oberhalb der anaeroben Schwelle eine Beziehung zwischen der Belastungsintensität und der Aktivierung von Thrombozyten (114). Auch CHICHARRO et al. fanden eine verstärkte Aggregationsneigung der Thrombozyten nur nach einer 30-minütigen Belastung im Bereich der anaeroben Schwelle, während eine aerobe Dauerbelastung ohne Einfluss auf die Thrombozytenaggregation blieb (43). Ebenso unterstrichen auch WANG et al. eine Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von der Belastungsintensität. Nur bei einer Stufentestbelastung bis zum Abbruch aufgrund subjektiver Erschöpfung fanden die Autoren eine signifikante Zunahme der Aggregations- und Adhäsionsneigung, nicht aber nach einer moderaten Dauerbelastung bei ca. 55 % der maximalen Sauerstoffaufnahmefähigkeit (337).

Mit den Stufentests und der hochintensiven Kurzzeitbelastung wurden in dieser Arbeit ebenfalls zwei Belastungsinterventionen mit einer Intensität oberhalb der anaeroben Schwelle durchgeführt. Die nach dem Laufband- bzw. Radstufentest gemessenen durchschnittlichen Laktatwerte von 10,8 bzw. 12,5 mmol/l sowie von 15,1 mmol/l nach dem 90-Sekunden Test belegten den stark anaeroben Charakter der Belastungen. In Folge der anaeroben Energiebereitstellung kommt es durch Laktatbildung zu einem Abfall des pH-Wertes (143, 172). Als

Ausdruck der hohen Kreislaufbeanspruchung nahm die Herzfrequenz während der Stufentests auf maximal 184 (Radtest) bzw. 192 Schläge/min (Laufband) zu. Innerhalb von nur 90 Sekunden stieg während der Kurzzeitbelastung die Herzfrequenz ebenfalls auf 189 Schläge/min an und unterstrich die schlagartig zunehmende Beanspruchung der Leistung des Herz-Kreislaufsystems. Dabei darf auch von einer deutlichen Zunahme der im Gefäßbett wirkenden Scherkräfte ausgegangen werden. Die erwartete starke Freisetzung der Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin gibt einen weiteren Hinweis auf die außergewöhnlich hohe Beanspruchung des Organismus (174, 314). So stieg die AdrenalinKonzentration nach den Stufentests auf etwa das 7-fache und die NoradrenalinKonzentration auf etwa das 20-fache des Ruhewertes an (Tab. 5). In Folge der Kurzzeitbelastung fanden sich sogar Anstiege auf das 32-fache bzw. das 33-fache des Ruhewertes.

Sowohl einem Abfall des pH-Wertes (43, 114) als auch einer Zunahme von Scherkräften (45, 232, 324, 351) oder der Wirkung der Katecholamine (6, 164) wird eine aktivierende Wirkung auf die Funktion der Blutplättchen zugeschrieben. Als sogenannter schwacher Agonist (187) besitzt insbesondere Adrenalin eine stimulierende Wirkung auf Thrombozyten und findet daher seit über 40 Jahren in der Aggregometrie als Stimulans Verwendung (46, 299). Ebenso belegen zahlreiche Untersuchungen am Menschen, dass nach Infusion einer physiologischen Menge an Adrenalin eine Zunahme der Aggregation, ein Anstieg von aktivierungsabhängigen Sekretionsprodukten (PF₄, β -TG, TxB₂) sowie eine vermehrte Fibrinogenbindung und P-Selektin Expression gemessen werden kann (164).

Angesichts der kräftigen Katecholaminfreisetzung und der hohen Belastungsintensität mit ausgeprägter Laktatacidose erwies sich die Zunahme der Thrombozytenaktivität von in Ruhe durchschnittlich 0,9 % auf 1,6 % CD62P positive Thrombozyten gegen Ende des Laufbandstufentests als auffällig gering (Abb. 17). Auch für die Radergometrie fand sich nur eine geringe Zunahme der Thrombozytenaktivität, die das gesetzte Signifikanzniveau nicht erreichte. Noch erstaunlicher war, dass selbst durch die hochintensive Kurzzeitbelastung keine messbare Zunahme der Thrombozytenaktivität für CD62P provoziert werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die fehlende oder allenfalls nur minimale Aktivitätszunahme von P-Selektin bietet die Beobachtung, dass *in vitro* aktivierte und anschließend reinfundierte Thrombozyten zügig P-Selektin wieder von ihrer Oberfläche verlieren, aber in der Zirkulation verbleiben und sich auch weiterhin an Aggregationsvorgängen beteiligen (222). Der Verlust des oberflächengebundenen P-Selektins erfolgt am ehesten durch proteolytische Abspaltung, da gleichzeitig der Spiegel an löslichem P-Selektin im Serum in gleichem Maße anstieg. Die Autoren folgerten daraus, dass P-Selektin möglicherweise kein geeigneter Marker für eine

Thrombozytenaktivierung *in vivo* ist. Da jedoch auch 3 Minuten nach Reinfusion noch eine ausreichende CD62P Expression der reinfundierten Thrombozyten nachweisbar war und sich auch nach 10 Minuten noch eine messbare Teilaktivität zeigte, schränkten die Autoren ihre Aussage dahingehend ein, dass die Verwendung von CD62P auch weiterhin ein geeigneter Marker bleibt, wenn (a) die Blutentnahme entweder unmittelbar distal des aktivierenden Reizes bzw. (b) innerhalb von 5 Minuten nach Aktivierung erfolgt oder aber (c) der stimulierende Reiz eine kontinuierliche Aktivierung der Thrombozyten bewirkt (222).

Die verwendeten Stufentestverfahren stellten einen kontinuierlichen Reiz dar, der sich mit zunehmender Belastungsintensität immer weiter steigerte. Da ferner die Blutabnahmen unmittelbar nach Belastungsabbruch erfolgten, kann der beschriebene Verlust des P-Selektins von der Oberfläche den ausbleibenden Aktivitätsanstieg nach Belastung nicht hinreichend erklären. So gab die signifikante Zunahme von löslichem P-Selektin nach dem Laufbandtest einen wichtigen Hinweis in Richtung einer abgelaufenen Thrombozytenaktivierung (Tab. 8). Auch KIRKPATRICK et al. beobachteten eine Zunahme von löslichem P-Selektin nach wiederholter körperlicher Belastung und werteten diese Zunahme als Ausdruck einer fortschreitenden Aktivierung von Thrombozyten (176). Dennoch bleibt auch ein Anstieg von löslichem P-Selektin den zwingenden Beweis einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* schuldig. Neben den α -Granula der Thrombozyten ist P-Selektin auch ein konstitutiver Bestandteil der Weibel-Palade Körperchen von Endothelzellen und kann nach Stimulation auch von dort aus in die Zirkulation abgegeben werden (29, 44, 70, 82, 212).

Eine alternative Erklärung für den so geringen Anstieg der Zahl aktivierter Thrombozyten nach intensiver körperlicher Belastung erschließt sich aus der Beobachtung des funktionellen Verhaltens von Thrombozyten während cardiochirurgischer Eingriffe. Entgegen dem zu erwartenden thrombogenen Effekt des Operationstraumas und der stimulierenden Wirkung der körperfremden Oberfläche durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine wurde mehrfach ein Rückgang des Anteils aktivierter Thrombozyten während und nach der chirurgischen Intervention beobachtet (30, 122, 171, 334), obwohl gleichzeitig ein Anstieg aktivierungsabhängiger Sekretionsprodukte wie PF4 oder β -TG zu finden war (30, 122). Die Ursache für dieses Verhalten liegt darin begründet, dass durchflusszytometrisch nur zirkulierende Blutzellen erfasst werden können, während gefäßwandgebundene oder erst kürzlich aus der Zirkulation herausgefilterte aktivierte Thrombozyten der Untersuchung verborgen bleiben, obwohl ihre aktivierungsabhängigen Sekretionsprodukte serologisch nachweisbar bleiben (221). Neben ihrem beschleunigten Verbrauch wird der Verlust aktivierter Thrombozyten aus

der Zirkulation bei cardiochirurgischen Eingriffen zusätzlich durch die Adhäsion an die Fremdoberfläche des extrakorporalen Kreislaufs verursacht (105, 334).

Eine alternative Möglichkeit für den Verbleib aktivierter Thrombozyten in der Zirkulation ergibt sich durch die Oberflächenexpression von P-Selektin und die daraus resultierende Adhäsion an zirkulierende Leukozyten (119, 189). Diese Thrombozyten-Leukozyten Konjugate verbleiben länger in der Zirkulation als aktivierte Thrombozyten und wurden als sensibler Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* beschrieben (228). Eine solche Bildung von Konjugaten findet sich unter anderem während cardiochirurgischer Eingriffe (276), bei einem Myocardinfarkt (95) oder einer koronaren Herzkrankheit (94, 102) und soll mit einem erhöhten Rezidivrisiko nach koronarer Katheterintervention einhergehen (229).

In diesem Zusammenhang muss auch angefügt werden, dass RINDER et al. nach einer intensiven *in vitro* Stimulation von Vollblut mit Thrombin zunächst einen raschen Anstieg von CD62P positiven Thrombozyten fanden. Ihre Zahl war jedoch innerhalb von wenigen Minuten nach Stimulationsbeginn bereits wieder rückläufig, da es durch eine zunehmende Konjugatbildung zu einem Verbrauch singulärer aktivierter Thrombozyten kam (277).

5.4 Thrombozyten-Leukozyten Konjugate – methodische Aspekte

Vor diesem Hintergrund rückte im weiteren Studienverlauf der Aufbau einer Methodik zur Analyse von Konjugaten immer weiter in Blickfeld der Untersuchung. In enger Anlehnung an die Methodik zur Funktionsdiagnostik der Thrombozyten wurden alle Schritte der Probenaufbereitung so gewählt, dass eine artifizielle Aktivierung der Proben *in vitro* auf ein Minimum reduziert wird. Auf ein Schütteln oder Vortexen der Proben wurde ebenso verzichtet wie auf jegliche Zentrifugation oder ein Waschen der Zellen. Die Analyse aus dem Vollblut garantiert die Untersuchung der gesamten Zellpopulation ohne weiteren Zellverlust. So ergaben Untersuchungen von LI. et al einen Verlust von durchschnittlich 30 % der Leukozyten nach einem Waschen der Proben (195). Die Auswahl von Citrat als Antikoagulant beruhte auf der Erfahrung, dass für Citrat kaum Einflüsse auf die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten bekannt sind, während EDTA durch eine stärkere Komplexbindung für die Untersuchung von Zellkonjugaten ungeeignet ist (117).

Die Probenaufbereitung wurde jeweils binnen 5 Minuten nach Blutentnahme begonnen. Nach Vorwärmen des PBS-Puffers auf 37 °C Körpertemperatur erfolgte zunächst eine Verdünnung des Vollblutes im Verhältnis 1:4 als Ausgangslösung für die weiteren Untersuchungen. Durch die Verdünnung wird die Wahrscheinlichkeit für das nachträgliche Auftreten von Zell-Zell Interaktionen vermindert und so der Bildung von Konjugaten *ex vivo* vorgebeugt (226). Die Verdünnung im Verhältnis von 1:4 richtete sich nach dem von FURMAN et al. beschriebenen

Vorgehen (94). Eigene Vorversuche mit stärkerer Verdünnung führten zu keiner weiteren Abnahme des Anteils an Konjugaten. Durch die geringere Zellkonzentration in der Endprobe verlängerte sich jedoch die Messzeit am Durchflusszytometer, sodass es bei größerer Probenzahl oder rascher Probenabfolge zu Verzögerungen der Messung kommen kann.

Die Antikörperinkubation für 10 Minuten bei 37°C belässt das frisch entnommene Blut bei physiologischer Körpertemperatur und unterstützt eine zügige und vollständige Färbung der Zellen. In eigenen Vorversuchen zeigte sich, dass bei Inkubationszeiten über 10 Minuten hinaus keine weitere Farbstoffaufnahme mehr erfolgt. Hingegen muss für eine ausreichende Färbung bei Raumtemperatur die Inkubationszeit meist auf 20 Minuten verlängert werden (195, 196). Die Antikörpermenge für eine ausreichend sättigende Konzentration war zuvor in Vorversuchen bestimmt worden. Die Färbung wurde durch Verdünnung mit 2 ml PBS-Puffer einschließlich 1 % bovinem Serumalbumin bei 4 °C gestoppt. Ein Auswaschen von überschüssigen Antikörpern ist nach der Verdünnung nicht notwendig (221, 302). Die Zugabe des bovinen Serumalbumins diente der weiteren Reduktion der unspezifischen Färbung (297).

Zur Detektion der Leukozyten im Vollblut ist ein alleiniges Gating der Leukozyten aufgrund ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften zumeist unzureichend, da diese Gates vielfach durch Erythrozyten mit ähnlichen Streulichteigenschaften überlagert sind. Die Abgrenzung der Leukozyten gegenüber anderen Messereignissen erfolgte daher mit Hilfe des monoklonalen CD45 Antikörpers. Das CD45 Antigen findet sich konstitutiv auf Monozyten, Granulozyten sowie Lymphozyten und fehlt auf Thrombozyten und den Zellen der roten Reihe (24). Auf diese Weise gelingt ein sicheres Auffinden der Leukozyten im Vollblut. In eigenen Vorversuchen wurde die Reinheit des Leukozytengates in Teilstudie II auf > 96 % bestimmt. Abbildung 13 macht deutlich, dass ein nicht unerheblicher Anteil der verbleibenden Verunreinigung dadurch entsteht, dass aufgrund unspezifischer Färbung einige Erythrozyten nicht sicher gegenüber den Granulozyten abgegrenzt werden können.

Mit dem Ziel einer höheren Reinheit des Leukozytengates führen einige Autoren in Anlehnung an die zur Immunphänotypisierung von Leukozyten (316) gebräuchliche Methodik auch bei der Untersuchung von Konjugaten eine Lyse der Erythrozyten durch (94, 95, 101, 102, 274). Im Rahmen der weiteren Methodenevaluation erfolgten auch einige Versuche zur Auswirkung einer Erythrozytenlyse auf die Thrombozytenaktivität (Abb. 27). Dabei zeigte sich bereits in einer Zwischenauswertung nach 9 Probanden eine hochsignifikante Zunahme der CD62P Expression auf unstimulierten Thrombozyten nach der durchgeführten Lyse mit Hilfe des ImmunoPrep Reagent System® (Beckman Coulter). In gleicher Weise berichteten auch RITCHIE et al. über einen hochsignifikanten Anstieg der CD62P Aktivität von 2,6 % auf

16,6 % aktivierte Thrombozyten nach einer Erythrozytenlyse unter Verwendung der FACS lysing solution® (Becton Dickinson) (279). Neben einem direkt stimulierenden Effekt der Lyse auf die Thrombozyten wird vor allem die Freisetzung größerer Mengen an Adenosindiphosphat (ADP) aus den zerstörten Erythrozyten für die Aktivierung der Thrombozyten verantwortlich gemacht (195, 279). Da gerade CD62P (P-Selektin) als Rezeptor für die Adhäsion zwischen Thrombozyten und Leukozyten fungiert (189, 213), darf davon ausgegangen werden, dass eine Zunahme der CD62P Expression mit einer verstärkten Neigung zur Bildung von Konjugaten einhergeht. Erwartungsgemäß beschrieben dann auch LI et al. eine signifikante Zunahme der Konjugate von im Mittel 6 % bei unfixierter Verarbeitung auf durchschnittlich 32 % nach Verwendung des Red Blood Cell Lysing Buffer® (Sigma) (195). Weitere Versuche zur Erythrozytenlyse wurden daher eingestellt.

Zur weiteren Differenzierung der Leukozytensubpopulationen wurde die Methodik zur Analyse von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten für Teilstudie III durch Einführung eines monoklonalen CD14 Antikörpers auf eine 3-Farbenanalyse erweitert. Das CD14 Antigen ist ein einkettiges integrales Membranprotein phagozytierender Zellen mit einem Molekulargewicht von 53-55 kDa und dient als hoch affiner Rezeptor für komplexgebundene Lipopolysaccharide. CD14 besitzt eine hohe Oberflächenexpression auf Monozyten sowie Makrophagen und eine schwache Expression auf Granulozyten. Auf lymphozytären Zellen sowie auf Erythrozyten und Thrombozyten fehlt CD14 hingegen (66, 127, 322).

In der Darstellung der Leukozyten nach CD45 vs. CD14 (Abb. 15) können 3 eigenständige Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden. Die Reinheit der jeweiligen Gates wurde in Vorversuchen auf größer 98 % bestimmt. Die Intertestvariabilität für die Differenzierung der Leukozyten lag unter 3 %. Mit Hilfe der immunologischen Differenzierung gelingt eine klare Unterscheidung von Granulo-, Mono- und Lymphozyten mit einer auf ein Minimum reduzierten Probenmanipulation. Auf diese Weise können artifizielle Veränderungen wie eine Aktivierung der Proben, ein Zellverlust oder eine nachträgliche Bildung von Konjugaten durch provozierte Zell-Zell Kontakte, wie sich aus anderen Protokollen mit Wasch- oder Zentrifugationsschritten (229, 264), durch Fixierung (94, 95, 195) oder Erythrozytenlyse (101, 102, 195, 250) ergeben, vermieden werden.

Die Auswahl des Panleukozytenmarkers CD45 als Farbstoffkonjugation mit Phycoerythrin-Cyanin 5.1 (PC5, Emissionswellenlänge 660-680 nm) und des Monozytenmarkers CD14 als Konjugat mit Phycoerythrin-Texas Red®-x (ECD, 660-680 nm) sowie des thrombozyten-spezifischen CD41 Antikörpers als Farbstoffkonjugat mit Phycoerythrin (PE, 568-590 nm) stellt aufgrund der unterschiedlichen Wellenlängen sicher, dass alle Signale unabhängig

voneinander gemessen werden können. Da eine spektrale Überlappung in Richtung kürzerer Wellenlängen keine nennenswerte Auswirkung besitzt, sorgt die gewählte Anordnung von CD45 und CD14 im langwelligen Farbbereich dafür, dass auch größere Veränderungen in ihrer Expressionsstärke kaum Einfluss auf das thrombozyten-spezifische Messsignal erhalten (15, 183, 225, 297). In Vorversuchen wurde ferner das Ausmaß der spektralen Überlappung bestimmt und eine entsprechende Kompensation vorgenommen.

Die weitere Auswertung der Konjugatbildung erfolgte anhand des thrombozytenspezifischen CD41 Antikörpers. Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, zeigte sich für die unspezifische Färbung mit IgG1-PE (Isotyp-Kontrolle) eine einheitlich gefärbte Leukozytenpopulation. Demgegenüber fand sich nach der spezifischen Färbung mit CD41-PE eine doppelgipfelige Verteilung, in welcher der Anteil an Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten als eigenständige Population klar von den singulären Leukozyten unterschieden werden kann. Untersuchungen von RINDER et al. mit annähernd identischen Zellkonzentrationen in der Messlösung belegen, dass eine zufällige simultane Passage von Leukozyten und ungebundenen Thrombozyten durch die Messkammer weitgehend ausgeschlossen werden kann und tatsächlich echte Konjugate gemessen werden (278). In Teilstudie II wurde dieser Anteil an Konjugaten in Ruhe auf durchschnittlich $11,7 \pm 3,7$ % bestimmt. Bei ebenfalls unfixierter Aufbereitung mit stärkerer Probenverdünnung und insgesamt längerer Inkubationszeit bei Raumtemperatur berichteten LI et al. in der von ihnen untersuchten Gruppe gesunder Normalpersonen über einen geringfügig höheren Anteil an Konjugaten von durchschnittlich $15,9 \pm 9,4$ Prozent (195). Die an gleicher Stelle berichtete Inter-Assay Variabilität von 11 % zeigte eine gute Übereinstimmung mit der in Teilstudie II gemessenen Testvariabilität von 11,7 %. Nach Differenzierung der Leukozytensubpopulationen lag die Intertestvariabilität zwischen 11,3 % bei den Lymphozytenkonjugaten und 15,1 % in der Auswertung der Monozytenkonjugate.

Bereits in Teilstudie II zeigte sich bei der Untersuchung der Probenstabilität eine höchst signifikante und kontinuierliche Zunahme des Anteils an Konjugaten bei zunehmender Lagerungsdauer (Abb. 28). In diesem Zusammenhang fanden HAGBERG & LYBERG, dass auch eine Fixierung der Proben mit 0,5 % Paraformaldehyd eine kontinuierliche Bildung von Konjugaten *in vitro* nicht sicher unterdrücken kann (117). Ebenso beschrieben LI et al. eine zeitabhängige Zunahme der Konjugatbildung unabhängig davon, ob die Proben unfixiert gelagert wurden oder zuvor mit Formaldehyd oder Paraformaldehyd fixiert worden waren (195). Ferner führte die Fixierung zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Konjugaten auf Werte zwischen 25 und 35 % in Ruhe. Einen vergleichbar hohen Anteil an Konjugaten fanden auch RINDER et al. nach Fixierung von unstimulierten Vollblutproben mit Paraformaldehyd.

Hier lagen die in Ruhe bestimmten Werte zwischen 36 % für Lymphozyten- und 45 % für Monozytenkonjugate (277). In wie weit durch die zusätzlich erfolgten Waschschrte eine artifizielle Zunahme an Konjugaten *in vitro* noch verstärkt wurde, ist nur schwer abschätzbar (117). Demgegenüber fanden sich in Teilstudie III bei unfixierter Verarbeitung in Ruhe Werte von durchschnittlich 6,3 % Lymphozyten- und 17,4 % Monozytenkonjugaten.

Es muss davon ausgegangen werden, dass Paraformaldehyd eine Konjugatbildung *in vitro* nicht unterdrücken kann. Werden fixierte Thrombozyten durch Präparation von plättchenreichem Plasma und Gelfiltration isoliert und anschließend mit zuvor ebenfalls isolierten Granulozyten inkubiert, so zeigt sich auch ohne weitere Stimulation trotz der vorgenommenen Fixierung bereits nach 30 Minuten ein Anteil an *in vitro* gebildeten Konjugaten von ca. 34 %. Die Vergleichswerte für eine identische Versuchsreihe mit Monozyten lagen sogar bei über 80 % Konjugaten (278). Vor diesem Hintergrund und dem bereits in Teilstudie 1 diskutierten stimulierenden Effekt von Paraformaldehyd auf die Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten wurde für die Analyse der Konjugatbildung im weiteren Vorgehen auf eine Fixierung der Proben verzichtet.

Da die artifizielle Bildung der Konjugate *in vitro* mit zunehmender Lagerung der Proben weiter voranschreitet, muss auf eine möglichst zügige Probenverarbeitung geachtet werden. In der vorliegenden Studie wurde die Probenaufbereitung binnen 5 Minuten nach Blutentnahme begonnen und alle Messungen innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen. Ferner ist eine ausreichende Vergleichbarkeit der Konjugatbildung in Ruhe und nach Belastung dadurch gegeben, dass alle Messungen streng nach den gleichen Abläufen erfolgten und damit jeweils den identischen Einflüssen unterlagen.

Auch in Teilstudie III ergab sich in den Messungen zur zeitlichen Stabilität der untersuchten Proben eine signifikante Zunahme der Konjugatbildung mit zunehmender Lagerungsdauer (Abb. 33). Diese Zunahme war bei Monozyten- und Granulozyten am stärksten ausgeprägt. Doch auch für die Zahl der Lymphozytenkonjugate wurde die Zunahme bereits nach einer Lagerungszeit von 30 Minuten signifikant. Der klare Anstieg an Konjugaten mit zunehmender Lagerung wirft die Frage danach auf welcher Anteil an Konjugaten bereits *in vivo* entstanden ist und wie viele Konjugate sich erst nach der Blutentnahme gebildet haben. Diese Überlegung schließt die Frage ein, ob eine vermehrte Konjugatbildung als Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* dienen kann. Sollte die Mehrzahl der Konjugate erst *ex vivo* entstanden sein, so müsste die Zunahme an Konjugaten nach Belastung als indirekter Hinweis auf eine gesteigerte Reaktivität der Thrombozyten gewertet werden.

Ein wichtiger Hinweis für die gestellte Frage kann durch die Verwendung von blockierenden Antikörpern gewonnen werden. Nach Zugabe eines ganzen Cocktails an blockierenden Antikörpern gegen die aktiven Zentren von CD62P und CD15 sowie die beteiligten Integrine GP IIb-IIIa und CD11b/CD18 unmittelbar nach Blutentnahme beobachteten Li et al. für unstimulierte Vollblutproben keinen messbaren Rückgang an Konjugaten gegenüber einer einfachen Immunfluoreszenzmarkierung. Da die Zugabe der blockierenden Antikörper gleichzeitig in der Lage war, die Bildung von Konjugaten *in vitro* nach Stimulation mit ADP vollständig zu unterdrücken, schlossen die Autoren, dass die überwiegende Mehrzahl der gemessenen Konjugate bereits *in vivo* entstanden sein muss (196). Ebenso konnten auch RINDER et al. durch Zugabe des Peptides RGDS, welches die Bindungsdomäne der Integrine blockiert, den „baseline“ Anteil an Konjugaten in ruhendem Vollblut nicht unter 15 Prozent drücken (277). In einer wegweisenden Arbeit zu Entstehung von Konjugaten konnten MICHELSON et al. in einer Versuchsreihe an Pavian-Affen zeigen, dass nach Reinfusion von aktivierten autologen Thrombozyten, welche nach Isolation mit Thrombin aktiviert und mit Biotin markiert worden waren, die markierten Thrombozyten in anschließenden venösen Blutentnahmen bereits nach einer Minute in Form von zirkulierenden Monozyten- und Granulozytenkonjugaten wiederzufinden waren (228). Noch 30 Minuten nach Reinfusion der aktivierten Thrombozyten waren entsprechende Thrombozyten-Monozyten Konjugate auf hohem Niveau nachweisbar, während binnen weniger Minuten von den aktivierten und markierten Thrombozyten kaum noch singuläre Zellen in der Zirkulation verblieben waren. Die Autoren folgern daraus, dass die Konjugate in erster Linie *in vivo* entstanden sind und einen sensitiveren Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* wiedergeben als die Messung von P-Selektin (228, 264). Entsprechend darf auch die Zunahme der Thrombozyten-Leukozyten Konjugate nach körperlicher Belastung als Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* gewertet werden.

5.5 Thrombozyten-Leukozyten Konjugate – körperliche Belastung

Teilstudie II untersuchte erstmalig die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten nach einer körperlichen Belastung. Obwohl nach dem Dauertest keine messbare Zunahme der Thrombozytenaktivität gefunden werden konnte, so zeigte sich dennoch ein Anstieg des Anteils an Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten von durchschnittlich 11,7 % vor auf 16,1 % nach Belastung ($p \leq 0,01$). Dieser Anstieg war 2 Stunden nach Belastungsende vollständig reversibel (Abb. 26). Parallel zum Anstieg der Thrombozytenzahl nach Belastung erhöhte sich auch die Zahl der zirkulierenden Leukozyten von 5,0 auf 9,6 Gpt/l. Im Gegensatz zur belastungsinduzierten Thrombozytose zeigte sich die Leukozytenzahl auch 2 Stunden nach Belastungsende noch nicht wieder reversibel sondern stieg sogar weiter auf 10,1 Gpt/l an

(Tab.11). Daraus kann errechnet werden, dass trotz des Rückganges des relativen Anteils an Konjugaten die absolute Zahl der zirkulierenden Konjugate auch 2 Stunden nach Belastungsende noch gegenüber dem Ausgangswert in Ruhe verdoppelt bleibt.

Gleichzeitig verwies die weitere Differenzierung der Leukozyten auf ein unterschiedliches Verhalten der einzelnen Zellreihen. Während die Zunahme der Leukozytenzahl unmittelbar nach Belastung auf einem überproportionalen Anstieg der Lymphozyten beruhte, wurde die anhaltend hohe Leukozytenzahl zwei Stunden nach Belastung nahezu ausschließlich durch eine Vermehrung der Granulozyten getragen. Die verzögerte Freisetzung von Granulozyten nach Belastung entspricht einem bekannten Phänomen und kann auf die Wirkung der belastungsinduzierten Ausschüttung von Kortisol zurückgeführt werden (98).

Das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Zellreihen ist insofern von Bedeutung, als bekannt ist, dass die einzelnen Leukozytensubpopulationen eine unterschiedliche Neigung zur Bildung von Konjugaten besitzen. Während REDLICH et al. in unstimulierten Vollblut mit einem leichten Überwiegen der Monozyten jeweils etwa einen Anteil von 20 % Monozyten- und Granulozytenkonjugate fanden, lag der Anteil an Konjugaten zwischen Lymphozyten und Thrombozyten nur bei ca. 10 Prozent (274). In einer Versuchsreihe zur Stimulation der Konjugatbildung *in vitro* von HAGBERG & LYBERG reichten bereits geringe Konzentration von ADP oder TRAP-6 aus, um den Anteil an Monozytenkonjugaten auf deutlich über 50 % zu steigern, während Granulozyten erst verzögert auf eine intensive TRAP-6 Stimulation mit einer signifikanten Konjugatbildung reagierten. Die Stimulationen hatten keinen Effekt auf die Bildung von Lymphozytenkonjugaten (117). Ebenso berichteten auch RINDER et al. nach einer Thrombinstimulation von einer raschen Zunahme an Monozytenkonjugaten und einer verzögerten Reaktion der Granulozyten. Die Stimulation blieb erneut ohne jeden Einfluss auf die Zahl der Lymphozytenkonjugate (277).

Vor diesem Hintergrund erfolgte in Teilstudie III der Ausbau der Methodik zu einer 3-Farben-Analyse zur immunologischen Differenzierung der Leukozytensubpopulationen. Wie für die Dauerbelastung in der vorausgegangenen Studie konnte auch nach der hochintensiven Kurzzeitbelastung ein signifikanter Anstieg der Konjugatbildung beobachtet werden, obwohl sich in der direkten Messung der Thrombozytenaktivität keine Veränderung ergeben hatte. In der Analyse der einzelnen Subpopulationen bestätigte sich die Erwartung einer unterschiedlichen Neigung zur Bildung von Konjugaten (Abb. 31). So stieg der Anteil an Granulozytenkonjugaten von 12,2 % vor auf 20,2 % nach Belastung an, während der Anteil an Monozytenkonjugaten schon in Ruhe bei 17,4 % bestimmt werden konnte und nach Belastung bis auf 37,8 % zunahm. Die geringste Neigung zur Konjugatbildung besaßen die Lymphozyten mit in

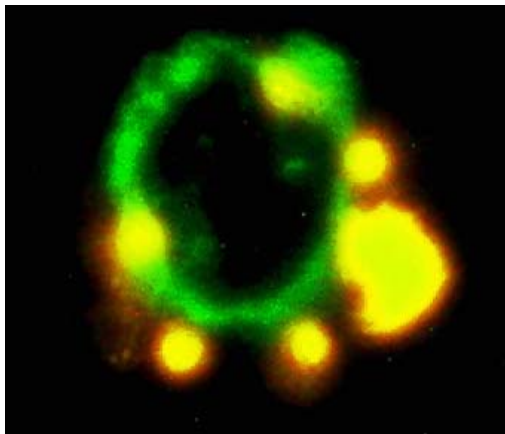
Ruhe 6,3 %. Entgegen der Beobachtung, dass durch eine *in vitro* Stimulation von Vollblut der Anteil an Lymphozytenkonjugaten nicht gesteigert werden konnte (117, 277), zeigte sich nach dem 90-Sekunden Test auch ein signifikanter Anstieg der Lymphozytenkonjugate auf 9,3 %.

In einer detaillierten Arbeit fanden DE BRUIJNE-ADMIRAAL et al., dass sich die Fähigkeit der Lymphozyten zur Bildung von Konjugaten auf die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und eine bislang nicht weiter differenzierte Subpopulation von CD4 und CD8 positiven T-Zellen beschränkt, während die überwiegende Mehrzahl der B- und T-Lymphozyten keine Konjugate eingehen. Die Autoren fanden ferner eine klare Korrelation zwischen der Expression von Sialyl-Lewis^x (CD15) auf der Oberfläche von Leukozyten und ihrer Neigung zur Bildung von Konjugaten (57). Die Ursache des unerwartet klaren Anstiegs an Lymphozytenkonjugaten beruht möglicherweise auf der Beobachtung, dass die starke Zunahme der Lymphozytenzahl nach einer intensiven Kurzzeitbelastung mit einer überproportional starken Mobilisation von NK-Zellen einhergeht (97).

Nach aktueller Auffassung erfolgt die Verbindung zwischen Thrombozyten und Leukozyten zunächst über einen Kontakt von P-Selektin (CD62P) auf aktivierten Thrombozyten mit dem P-Selektin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) oder Sialyl-Lewis^x (CD15) auf Leukozyten (78, 198, 277). Dieser Kontakt setzt eine Aktivierung der Thrombozyten mit nachfolgender Expression von P-Selektin voraus (119, 189) und kann durch eine entsprechende Stimulation der Thrombozyten mit bekannten Agonisten, nicht aber über eine Stimulation von Granulozyten oder Monozyten mit L-Formyl-Methionyl-Lysyl-Prolin (fMLP) verstärkt werden (274). Dabei besteht für moderate Stimulationen eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der CD62P Expression von Thrombozyten und der Bildung von Konjugaten (117). Unter Scherkraftbedingungen besitzt P-Selektin zwar eine hohe Affinität aber auch eine rasche Dissoziationsrate, sodass über den alleinigen Kontakt noch keine stabile und dauerhafte Verbindung entstehen kann (191). In einem zweiten Schritt kommt es daher durch den P-Selektin abhängigen Kontakt zu einer Aktivierung des CD11b/CD18 Integrins (MAC-1) auf der Leukozytenmembran (78, 249). Unter Mitwirkung eines weiteren aktivierten Integrins, dem GP IIb-IIIa Komplex auf der Thrombozytenmembran, wird dann die Zell-Zell Verbindung ähnlich der Thrombozytenaggregation über Fibrinogenbrücken dauerhaft stabilisiert (77, 198, 199, 308). Darüber hinaus wird die Beteiligung weiterer Rezeptoren wie etwa die Verbindung zwischen CD40 und dem CD40 Liganden (CD40L) diskutiert (132).

Auch in der Auswertung der Konjugatbildung mit Hilfe der MFI für CD41-PE kam es nach der Kurzzeitbelastung jeweils zu einem signifikanten Anstieg (Abb 32). Auffällig war dabei,

dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Leukozytensubpopulationen in ihrer Neigung zur Konjugatbildung in der Auswertung der MFI für CD41-PE stärker zu Tage traten, als dies in der Auswertung nach % positiven Zellen zuvor zu erwarten gewesen war. Die überproportional hohe MFI für CD41-PE, wie sie vor allem für die Monozyten beobachtet werden konnte, beruht darauf, dass ein weißes Blutkörperchen gleichzeitig mehrere Thrombozyten binden kann. Entsprechend geht eine größere Neigung zur Konjugatbildung neben einem höheren Anteil an Konjugaten in der Auswertung nach % positiven Zellen auch mit einer Zunahme der Konjugatgröße durch Anlagerung mehrerer Thrombozyten einher. Bereits in einer der ersten Arbeiten zur Bildung von Konjugaten *in vitro* beschrieben JUNGI et al. nach der mikroskopischen Untersuchung einer gemischten Lösung aus isolierten Leukozytensubpopulationen und mit Thrombin stimulierten Thrombozyten die Entstehung sogenannter *Rosettenformen*, bestehend aus einem zentralen weißen Blutkörperchen und einem Ring von angelagerten Blutplättchen (160). Vor Einführung durchflusszytometrischer Analysen bestand die Quantifizierung der Konjugate in der mikroskopischen Handauszählung solcher



Rosettenformen. Abbildung 34 zeigt eine eigene fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines einzelnen Leukozyten mit mehreren adhärenen Thrombozyten.

Abbildung 34:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Leukozyten (CD45-FITC, grün) mit mehreren anheftenden Thrombozyten (CD41-PE; orange) in typischer Rosettenformation (Vergrößerung 630-fach)

In einer späteren Folgestudie, die über den Rahmen der vorgelegten Arbeit hinausgeht, wurde die Methodik unter Verwendung eines *CytomicsTM FC500* Durchflusszytometers (Beckman Coulter) auf eine 5-Farben-Analyse ausgebaut (138). Nach Durchführung eines erneuten 90-Sekunden Tests (all out) konnten die Ergebnisse von Teilstudie III reproduziert werden und es zeigte sich, dass bevorzugt junge Monozyten ($CD14^{+}16^{-}$) gegenüber reiferen Monozyten ($CD14^{+}16^{+}$) zur Konjugatbildung neigen und dass diese Konjugate die höchste Expression für CD62P aufweisen. Durch eine zusätzliche Stimulation mit TRAP-6 ließ sich die Konjugatbildung nach Belastung weiter verstärken. Eine vermehrte Bildung von Konjugaten nach einem Stufentest und einer Dauerbelastung von 90 % der IAS fand sich später auch für Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ II sowie einer gesunden Kontrollgruppe (137). Auch nach Dauerbelastungen von 80 % und 100 % der IAS bei untrainierten Normalpersonen

konnte von der Arbeitsgruppe eine gesteigerte Konjugatbildung nachgewiesen werden (139). Dabei war nach der intensiveren Dauerbelastung die Konjugatbildung signifikant gegenüber der moderaten Intensität gesteigert. Ebenso berichten auch LI et al. von einer Zunahme zirkulierender Konjugate nach einem Stufentest (197).

Demgegenüber zeigte sich in einer Untersuchung von WANG & LIAO nach einer moderaten Dauerbelastung bei 60 % VO_2max eine Reduktion der Interaktion zwischen Granulozyten und oberflächengebundenen Thrombozyten unter Stimulation durch Scherkraftbedingungen (343). Ebenso konnte ein Rückgang der belastungsinduzierten Aggregation zwischen Granulozyten und Thrombozyten als Folge einer vorausgehenden Aufwärmphase von 20 Minuten bei 40 % VO_2max gefunden werden (341). Hinzugefügt werden muss, dass in den beiden letztgenannten Studien das Reaktionsverhalten von isolierten und bei wechselnden Umgebungsbedingungen wieder resuspendierten Zellpopulationen *in vitro* untersucht und nicht die Konjugatbildung *in vivo* gemessen wurde. Für die in Teilstudie III durchgeführte Aufwärmphase über 15 Minuten bei 50 % der IAS konnte hingegen kein Einfluss auf die Konjugatbildung gefunden werden (Abb. 31).

5.6 Ausblick

Unterschiedliche Methoden zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion und nur selten direkt vergleichbare Belastungsformen haben in der Vergangenheit erheblich zu den widersprüchlichen Studienergebnissen über den Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Thrombozytenfunktion beigetragen. Dennoch legen die meisten Übersichtsarbeiten heute Veränderungen in der Thrombozytenfunktion im Rahmen der belastungsinduzierten Thrombozytose nahe und machen trotz einiger Widersprüche eine Zunahme der Aktivität und/oder Reaktivität mit steigender Belastungsintensität wahrscheinlich (33, 73, 74, 273, 344). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bislang jedoch wenig verstanden.

So wurde eine signifikante Zunahme der Thrombozytenfunktion nur für Belastungen oberhalb der anaeroben Schwelle gefunden (114, 337). Demgegenüber zeigte sich in Teilstudie III nach der 90-sekündigen Maximalbelastung mit einem durchschnittlichen Laktatanstieg auf über 15 mmol/l zwar ein Anstieg der Reaktivität aber keine messbare Zunahme der Aktivität. Andererseits konnte nach der submaximalen Dauerbelastung in Teilstudie II ebenfalls eine Zunahme der Reaktivität beobachtet werden, obwohl mit durchschnittlich 3,1 mmol/l nur ein moderates Laktat-Steady-State vorlag.

Anhand eines klaren Anstieges von Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT) und Prothrombinfragmenten (PF1+2) nach einer intensiven Belastung konnten BÄRTSCH et al. eine messbare Thrombinbildung unter Belastung nachweisen (17, 348). Entsprechend ist auch eine

Stimulation der Thrombozytenaktivität durch Thrombin, einem starken Agonisten, denkbar. Doch konnten MÖCKEL et al. keinen direkten Zusammenhang zwischen Thrombinbildung und Thrombozytenfunktion nach einer intensiven Belastung herstellen (233).

Die vielleicht führende Bedeutung wurde bislang der Wirkung von Katecholaminen (13, 194, 235, 305, 324, 333) zugeschrieben, welche mit steigender Belastungsintensität verstärkt freigesetzt werden. Die Stimulation ist vorwiegend über die Bindung von Noradrenalin an α_2 -Rezeptoren vermittelt (151). Zusätzlich beschreiben WANG & CHENG eine Modulation der Rezeptordichte und Affinität von α_2 -Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche nach körperlicher Belastung (340). Neben der stimulierenden Wirkung auf Thrombozyten führt ein Anstieg der Katecholamine zu einer vermehrten Freisetzung des von-Willebrand-Faktors (vWF) und von Gerinnungsfaktor VIII (164). Die erhöhten Faktorkonzentrationen bieten eine sinnvolle Erklärung für die Zunahme der vWF-vermittelten Zunahme der Thrombozytenadhäsion und Aggregation, wie sie in mehreren Arbeiten mit simulierten Scherkraftbedingungen nach Belastung gefunden wurde (152, 324, 333, 342). In Teilstudie I konnte nach dem Laufbandstufentest parallel zu einem starken Katecholaminanstieg auch eine signifikante Zunahme der Thrombozytenaktivität und Reaktivität gemessen werden. Demgegenüber zeigte sich nach dem hochintensiven 90-Sekunden Test in Teilstudie III zwar ebenfalls eine Zunahme der Reaktivität aber keine Steigerung der Aktivität, obwohl gegenüber den Stufentestverfahren ein 3-fach höherer Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin gemessen werden konnte. Möglicherweise kommt neben dem Ausmaß der Katecholaminfreisetzung auch der Belastungsdauer eine eigenständige Bedeutung zu. Ferner ist anzumerken, dass Katecholamine als sogenannte *schwache Agonisten* zur vollständigen Aktivierung von Thrombozyten auf die Unterstützung durch einen weiteren Agonisten angewiesen sind (187). Wohl aber besitzen sie die Fähigkeit die Wirkung anderer Agonisten zu verstärken (6, 340). Ein solches *Priming* von Thrombozyten entspricht der messbaren Zunahme der Reaktivität.

In einer methodisch bemerkenswerten Arbeit konnten YEGUTKIN et al. die Aktivitätssteigerung von Thrombozyten nach intensiver Belastung auf die Wirkung eines intravasalen ADP-Anstiegs zurückführen (356). Gleichzeitig konnten die Autoren zeigen, dass die Inkubation von ruhenden Thrombozyten mit dem nach Belastung entnommenen Blutplasma eine Aktivierungsreaktion der Thrombozyten triggert und dass die Aktivierung stärker ausfällt als die Inkubation mit einer identischen ADP-Konzentration. Daraus muss gefolgert werden, dass weitere Plasmaprodukte zur Aktivierung beitragen.

Zusätzlich induziert eine körperliche Belastung eine vermehrte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) und Prostazyklin aus Endothelzellen – zwei potente Inhibitoren

der Thrombozyten (35, 159, 223, 283). Auch Thrombozyten besitzen im Sinne eines autologen Aktivierungsschutzes die Fähigkeit zur Produktion von NO und setzen dieses unter intensiver Belastung vermehrt frei (168). Die in einigen Arbeiten beobachtete Abnahme der thrombozytären Aktivität und Reaktivität nach moderater Belastung wird in erster Linie auf die Wirkung von NO zurückgeführt (337, 339, 341, 343). Im Sinne der Infarktprophylaxe konnte an Koronarpatienten gezeigt werden, dass durch regelmäßiges Training die Endothelfunktion und NO-Freisetzung messbar verbessert werden kann (118, 336).

Leider existieren derzeit nur wenige kontrollierte, prospektive Studien zum Einfluss regelmäßigen Trainings auf die Thrombozytenfunktion (74). In je einer Studie an Männern und Frauen konnten WANG et al. einen Rückgang der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten sowohl in Ruhe als auch nach einer intensiven Belastung in Folge eines 8-wöchigen Ausdauertrainings feststellen. Nach einer mehrwöchigen Trainingsunterbrechung kehrte die Thrombozytenfunktion wieder auf das Ausgangsniveau zurück (338, 339). Nach einem 20-wöchigen Trainingsprogramm fanden auch DI MASSIMO et al. eine Abnahme der Aggregationsneigung und führten diese auf eine höhere Verfügbarkeit von Stickoxiden und einen verbesserten antioxidativen Schutz zurück (62). Ebenso konnte erst kürzlich von einer Abnahme der Plättchenaktivität und einer Zunahme der NO-Produktion in Thrombozyten nach einem 12-wöchigen Training berichtet werden (60).

Über den Einfluss unterschiedlicher Belastungsintensitäten auf das Wechselspiel zwischen aktivitätsfördernden und hemmenden Mechanismen bestehen derzeit nur unzureichende Kenntnisse. Aufgabe weiterer Untersuchungen muss es sein, mit Hilfe der entwickelten Methodik die Wirkung unterschiedlicher Intensitäten auf die Thrombozytenfunktion und Konjugatbildung zu untersuchen. Dabei wird es wichtig sein, auch andere Probandengruppen mit geringerer Leistungsfähigkeit, höherem Lebensalter oder Gefäßerkrankungen einzubeziehen und neben den Veränderungen durch eine akute Belastungsintervention auch mögliche Trainingseffekte zu erfassen. Zukünftige Studien werden sich an zwei Zielen orientieren müssen, nämlich der Sicherheit vor unerwünschten thrombembolischen Ereignissen und optimierten Trainingsvorgaben im Sinne einer verbesserten Prävention.

Ebenso sind die Mechanismen und Wirkungen der Bildung und Auflösung von Konjugaten bislang wenig verstanden. So wird etwa der Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten an oberflächengebundene aktivierte Thrombozyten eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Leukozyten in einen wachsenden Thrombus (41, 115, 254) oder einen lokalen Entzündungsprozess (67, 132, 198) zugeschrieben. Über Signaltransduktionswege, die sowohl Integrine (GP IIb-IIIa, CD11b/ CD18) und P-Selektin (77, 78) als auch die Interaktion zwischen CD40

und CD40Ligand (132) einschließen, können aktivierte Thrombozyten die Expression proinflammatorischer Cytokine (242) und die Freisetzung von Superoxid-Anionen (oxidativer burst) in Monozyten und Granulozyten (20, 240) stimulieren. Darüber hinaus können aktivierte Thrombozyten eine Expression von Gewebsthromboplastin auf Monozyten hervorrufen und so durch Stimulation der extrinsischen Gerinnung die weitere Thrombusformation unterstützen (41). Im Sinne einer negativen Feedbackschleife existiert andererseits ein hocheffektiver Mechanismus der gegenseitigen Hemmung, da wahrscheinlich sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten die Fähigkeit zur Bildung von NO besitzen (18, 79, 168). Darüber hinaus wirkt gelöstes P-Selektin als potenter Inhibitor des oxidativen Bursts (100, 353). Für die komplexe Interaktion zwischen Thrombozyten und Granulozyten konnten WANG et al. zeigen, dass die von Thrombozyten stimulierte Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen in Granulozyten durch eine intensive körperliche Belastung verstärkt wird, während eine moderate Belastungsintensität die Bildung eher unterdrückt (341).

Wenngleich sich die Messung von Konjugaten als hoch sensibler Marker einer Thrombozytenaktivierung in vivo erwiesen hat, so besteht dennoch weitgehende Unklarheit über die physiologische Bedeutung der Konjugatbildung unter körperlicher Belastung. Inwieweit etwa für Gesunde die beobachtete Konjugatbildung nach Belastung eine Thrombusneigung verstärkt oder auf die Bildung bzw. Prävention arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen Einfluss nimmt, ist bislang kaum untersucht. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Zell-Zell Interaktionen und ihre Bedeutung zu verstehen. So könnte eine mögliche Bedeutung für zukünftige Messungen der Konjugatbildung nach einer Belastungsintervention in der diagnostischen Untersuchung von frühfunktionellen Störungen der Gefäßwand liegen, wie sie einer manifesten Arteriosklerose meist vorausgehen (118).

6 Zusammenfassung

Eine Zunahme der Zahl zirkulierender Thrombozyten nach körperlicher Belastung ist langjährig bekannt. Indes besteht erhebliche Unstimmigkeit darüber, inwieweit die belastungsinduzierte Thrombozytose von einer gesteigerten Thrombozytenfunktion begleitet wird und ob diese mit einem erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse einhergeht. Unterschiedliche Methodiken in der Untersuchung von Teilaspekten der Thrombozytenfunktion (Adhäsion, Aggregation, Sekretion) und wenig vergleichbare Belastungsformen haben erheblich zu den meist widersprüchlichen Ergebnissen beigetragen. Mit Einführung der Durchflußzytometrie in die Untersuchung der Thrombozytenfunktion konnten zahlreiche Probleme gelöst werden. Dennoch ergaben sich auch hier widersprüchliche Ergebnisse und vor allem hinsichtlich der Probenaufbereitung und Fixierung blieben wichtige methodische Fragen ungeklärt.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand der Aufbau und die Weiterentwicklung einer durchflußzytometrischen Methodik zur differenzierten Untersuchung der Thrombozytenfunktion im Rahmen der belastungsinduzierten Thrombozytose. Die Arbeit basiert auf drei aufeinander aufbauenden Teilstudien bestehend aus einer maximalen Stufentestbelastung (Teilstudie I), einem submaximalen Dauerlauf über 60 bis 120 Minuten bei einer Intensität von 90 % der individuellen anaeroben Schwelle (Teilstudie II) sowie einer hochintensiven Kurzzeitbelastung (90 Sekunden *all-out*; Teilstudie III) und konzentriert sich gemäß dem Arbeitstitel auf die labormethodischen Aspekte des Untersuchungsganges. Die jeweiligen Belastungen gewannen dabei eine doppelte Funktion. Zum einen entsprachen sie dem eigentlichen Untersuchungsgegenstand und zum anderen dienten sie darüber hinaus als externe Stimuli, um die Sensitivität der Methodik zu erproben.

Mit allen Belastungsinterventionen konnte eine signifikante Zunahme der Zahl zirkulierender Thrombozyten erreicht werden. Diese ging mit Ausnahme der submaximalen Dauerbelastung auch mit einer signifikanten Zunahme des mittleren Thrombozytenvolumens einher.

Durch Parallelmessung von unfixierten sowie nachträglich und direkt fixierten Proben in Teilstudie I konnte gezeigt werden, dass in Folge der Fixierung (Paraformaldehyd) die Oberflächenexpression der aktivierungsabhängigen Membranproteine CD62P, PAC-1 und CD41 unterschiedlich stark anstieg, während es gleichzeitig zu einem Rückgang der CD42b Expression kam. Diese Veränderungen mussten im Sinne einer systematischen Aktivierung durch die Wirkung der Fixierung gedeutet werden. Unter den direkten Aktivierungsmarkern erwies sich die Expression von CD62P gegenüber PAC-1 als weniger anfällig für eine artifizielle Aktivierung *in vitro*.

In Folge des Laufbandstufentests kam es in der Auswertung von CD62P und PAC-1 zu einem minimalen, aber signifikanten Anstieg der Thrombozytenaktivität in den unfixierten und nachträglich fixierten Proben. Nach der direkten Fixierung waren die Aktivitätsunterschiede nicht mehr messbar, da der Einfluss der Belastungsintervention durch die Fixierungswirkung vollständig überlagert wurde. Nach dem Fahrradstufentest konnte eine signifikante Zunahme der Thrombozytenaktivität nur für PAC-1 nicht aber für CD62P gefunden werden.

Nach moderater Stimulation mit TRAP-6 und ADP fand sich jeweils eine signifikante Zunahme der Reaktivität der Thrombozyten (CD62P, PAC-1). Hingegen waren nach starker Stimulation keine Unterschiede mehr nachweisbar und es darf gefolgert werden, dass in Folge der Stufentests in erster Linie die Reaktivität der vorhandenen Thrombozytenpopulation erhöht wird und nicht vermehrt reaktivere Thrombozyten ausgeschüttet werden. Gleichzeitig fand sich nach dem Laufbandstufentest ein signifikanter Anstieg von löslichem P-Selektin im Plasma und es stellte sich die Frage, warum angesichts der erreichten Ausbelastung nur ein so geringer Anstieg von aktivierten Thrombozyten gemessen werden konnte.

Unter der Vorstellung, dass singuläre aktivierte Thrombozyten zügig aus der Zirkulation entfernt werden aber auch die Fähigkeit zur Adhäsion an Leukozyten besitzen, erfolgte in Teilstudie II erstmalig die Messung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten. Obwohl nach der submaximalen Dauerbelastung keine messbare Veränderung der Thrombozytenaktivität (CD62P) gefunden werden konnte, so ergab sich dennoch ein hochsignifikanter Anstieg an Konjugaten. Ebenso fand sich eine klare Zunahme der Reaktivität (CD62P).

In Teilstudie III wurde die Methodik der Messung von Konjugaten zu einer 3-Farben-Analyse mit dem Ziel einer Differenzierung von Leukozytensubpopulationen ausgebaut. Die Auswahl der hochintensiven Kurzzeitbelastung erfolgte vor der Fragestellung, ob sich durch einen maximal intensiven Reiz eine Zunahme der Thrombozytenaktivität provozieren lässt. Erneut konnte keine Zunahme der Thrombozytenaktivität (CD62P) gefunden werden. Dies wurde durch die Messung von CD63, einem eigenständigen Aktivierungsmarker, bestätigt. Wiederum ergab sich eine signifikante Zunahme der Thrombozytenreaktivität (CD41, CD62P) und der Bildung von Konjugaten. Dabei besaßen Monozyten die stärkste, Granulozyten eine mittlere und Lymphozyten die geringste Neigung zur Konjugatbildung.

Die Durchflusszytometrie bietet eine hochempfindliche Methode, auch kleine Veränderungen der Aktivität und Reaktivität von Thrombozyten auf Einzelzellebene bei gleichzeitiger Erfassung einer großen Zellzahl zu untersuchen. Die Verwendung von Vollblut beugt durch den Verzicht auf Zentrifugations- oder Waschschrte einem Zellverlust vor und wirkt durch eine Reduktion der Probenmanipulation einer artifiziellen Aktivierung der Thrombozyten *ex vivo*

entgegen. Ferner konnte gezeigt werden, dass bei zügiger Aufbereitung der Proben die Analyse von unfixierten Thrombozyten nicht nur möglich, sondern gegenüber einer Fixierung auch der Vorzug zu geben ist. Da aktivierte Thrombozyten nicht lange in der Zirkulation verweilen, richtete sich das Augenmerk auf den Ausbau einer Methodik zur Messung von Thrombozyten-Leukozyten Konjugaten. Das Auftreten solcher Konjugate muss als hoch sensibler Marker einer Thrombozytenaktivierung *in vivo* interpretiert werden. Die physiologische Bedeutung der Konjugate ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Anhand der Belastungsinterventionen konnte auch für überwiegend gut Trainierte ein Anstieg der Thrombozytenfunktion in Form einer gesteigerten Reaktivität und einer vermehrten Konjugatbildung nachgewiesen werden. Verglichen mit der Intensität der durchgeführten Belastungen sind die gemessenen Funktionsveränderungen als moderat zu bewerten. Ein direktes Risikopotential für thrombembolische Ereignisse lässt sich für die untersuchte Probandengruppe nicht ableiten. Weitere Untersuchungen müssen über das Risikoprofil von Probanden mit beispielsweise geringerer körperlicher Fitness oder Gefäßerkrankungen Aufschluss geben und könnten Hinweise für die Gestaltung eines präventiven Trainings liefern. Mit der weiterentwickelten Methodik zur Untersuchung der Thrombozytenaktivität und Reaktivität sowie dem Aufbau einer Methodik zur Analyse von Konjugaten steht ein verlässliches und hoch sensibles Testsystem für weitere Studien zur Verfügung.

Literaturliste

1. Abrams C., Shattil S. J. 1991. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost*;65(5):467-73.
2. Abrams C. S., Ellison N., Budzynski A. Z., Shattil S. J. 1990. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood*;75(1):128-38.
3. Amarosi E., Garg S. K., Karpatkin S. 1971. Heterogeneity of human platelets. IV. Identification of a young platelet population with (75 SE) selenomethionine. *British Journal of Haematology*;21:227-232.
4. Anders O., Freund M. 1999. Übergerinnbarkeit und thrombophile Diathesen. In: Alexander K, Daniel WG, Diener H-W, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, editors. *Thiemes Innere Medizin: TIM*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. p. 970-976.
5. Andrews R. K., Shen Y., Gardiner E. E., Dong J. F., Lopez J. A., Berndt M. C. 1999. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost*;82(2):357-64.
6. Anfossi G., Trovati M. 1996. Role of catecholamines in platelet function: pathophysiological and clinical significance. *Eur J Clin Invest*;26(5):353-70.
7. Aster R. H. 1966. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *J Clin Invest*;45(5):645-57.
8. Ault K. A., Rinder H. M., Mitchell J. G., Rinder C. S., Lambrew C. T., Hillman R. S. 1989. Correlated measurement of platelet release and aggregation in whole blood. *Cytometry*;10(4):448-55.
9. Ault K. A. 1993. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann NY Acad Sci*;677:293-308.
10. Ault K. A., Knowles C. 1995. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation. *Experimental Haematology*;23:996-1001.
11. Ault K. A., Cannon C. P., Mitchell J., McCahan J., Tracy R. P., Novotny W. F., Reimann J. D., Braunwald E. 1999. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*;33(3):634-9.
12. Bach R. R. 1988. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem*;23:339-368.
13. Badimon L., Martinez-Gonzalez J., Royo T., Lassila R., Badimon J. J. 1999. A sudden increase in plasma epinephrine levels transiently enhances platelet deposition on severely damaged arterial wall--studies in a porcine model. *Thromb Haemost*;82(6):1736-42.
14. Balmer J., Davison R. C., Coleman D. A., Bird S. R. 2000. The validity of power output recorded during exercise performance tests using a Kingcycle air-braked cycle ergometer when compared with an SRM powermeter. *Int J Sports Med*;21:195-199.
15. Barlage S., Rothe G., Schmitz G. 1998. Platelet analysis by flow cytometry. In: Gutensohn K, Sonneborn H-K, Schunter F, Kühnl P, editors. *Flow cytometry in transfusion medicine. Analysis of platelets*. Heidelberg: Clin Lab Publications. p. 15-27.
16. Barthels M., Poliwoda H. 1998. *Gerinnungsanalysen*. 6. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

17. Bartsch P., Welsch B., Albert M., Friedmann B., Levi M., Kruithof E. K. 1995. Balanced activation of coagulation and fibrinolysis after a 2-h triathlon. *Med Sci Sports Exerc*;27(11):1465-70.
18. Bath P. M., Hassall D. G., Gladwin A.-M., Palmer R. M. J., Martin J. F. 1991. Nitric oxide and prostacyclin: divergence of inhibitor effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb*;11:254-260.
19. Bath P. M. 1993. The routine measurement of platelet size using sodium citrate alone as the anticoagulant. *Thromb Haemost*;70(4):687-90.
20. Bazzoni G., Dejana E., Del Maschio A. 1991. Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica*;76(491-499).
21. Bennett P. N. 1972. Effect of physical exercise on platelet adhesiveness. *Scand J Haematol*;9(2):138-41.
22. Berger G., Masse J. M., Cramer E. M. 1996. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood*;87(4):1385-95.
23. Berndt M. C., Shen Y., Doppeide S. M., Gardiner E. E., Andrews R. K. 2001. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost*;86(1):178-88.
24. Beverley P. C. L. 1980. Production and use of monoclonal antibodies in transplantation immunology. In: Touraine JL, Betuel H, Bronchier J, al. e, editors. *Transplantation and Clinical Immunology XI*. Amsterdam. p. 87 ff.
25. Bevers E. M., Comfurius P., Zwaal R. F. A. 1983. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta*;736:57-66.
26. Bierman H. R., Kelly K. H., Cordes F. L., Byron R. L., Polhemus J. A., Rappoport S. 1952. The release of Leukocytes and Platelets from the Pulmonary Circulation by Epinephrine. *Blood*;7:683-692.
27. Boneu B., Boneu A., Raison C., Guiraud R., Bierme R. 1973. Kinetics of platelet populations in the stationary state. *Thrombosis Research*;3:605-611.
28. Boneu B., Corberand J., Plante J., Bierme R. 1977. Evidence that platelet density and volume are not related to aging. *Thromb Res*;10(3):475-86.
29. Bonfanti R., Furie B. C., Furie B., Wagner D. D. 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*;73(5):1109-12.
30. Boonstra P. W., van Imhoff G. W., Eysman L., van der Heide H., Karliczek G. F., Wildevuur C. R. H. 1993. Reduced platelet activation and improved hemostasis after controlled cardiectomy suction during clinical membrane oxygenator perfusions. *J Thorac Cardiovasc Surg*;89:900-906.
31. Borcea V., Nawroth P. 1999. Kongenitale plasmatische Gerinnungsdefekte und Gerinnungsdefekte durch erworbene Hemmkörper. In: Alexander K, Daniel WG, Diener H-W, Freund M, Köhler H, Matern S, al. e, editors. *Thiemes Innere Medizin: TIM*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. p. 960-969.
32. Born G. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*;194:927-929.
33. Bourey R. E., Santoro S. A. 1988. Interactions of exercise, coagulation, platelets, and fibrinolysis--a brief review. *Med Sci Sports Exerc*;20(5):439-46.

34. Brass L. F. 1991. The biochemistry of platelet activation. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors. Hematology. Basic principles and practice. New York, NY USA: Churchill Livingstone. p. 1176-1197.
35. Britten M. B., Zeiher A. M., Schächinger v. 2000. Endothelfunktion und körperliche Aktivität. Deut Z Sportmed;51:118-122.
36. Brown A. S., Erusalimsky J. D., Martin J. F. 1997. Megakaryocytopoiesis: the megakaryocyte / platelets haemostasis axis. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. Platelets and their factors. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 3-26.
37. Broze G. J., Girard T. J., Novotny W. F. 1990. Regulation of coagulation by multivalent Kunitz-type inhibitor. Biochemistry;29:7539-7546.
38. Cade J. F., Doyle D. J., Chesterman C. N., Morgan F. J., Rennie G. C. 1982. Platelet function in coronary artery disease: effects of coronary surgery and sulfinpyrazone. Circulation;66(1):29-32.
39. Cahill M. R., Macey M. G., Newland A. C. 1993. Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P-selectin (CD62) and GP53 (CD63). Br J Haematol;84:527-529.
40. Castellino F. J. 1984. Biochemistry of human plasminogen. Semin Thromb Hemost;10:18-23.
41. Celi A., Pellegrini G., Lorenzet R., De Blasi A., Ready N., Furie B. C., Furie B. 1994. P-Selectin selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A;91(8767-8771).
42. Chamberlain K. G., Tong M., Penington D. G. 1990. Properties of the exchangeable splenic platelets released into the circulation during exercise-induced thrombocytosis. Am J Hematol;34(3):161-8.
43. Chicharro J. L., Sanchez O., Bandres F., Guantes Y., Yges A., Lucia A., Legido J. C. 1994. Platelet aggregability in relation to the anaerobic threshold. Thromb Res;75(3):251-7.
44. Chong B. H., Murray B., Berndt M. C., Dunlop L. C., Brighton T., Chesterman C. N. 1994. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. Blood;83(6):1535-41.
45. Chow T. W., Hellums J. D., Thiagarajan P. 2000. Thrombin receptor activating peptide (SFLLRN) potentiates shear-induced platelet microvesiculation. J Lab Clin Med;135(1):66-72.
46. Clayton S., Cross M. J. 1963. Aggregation of blood platelets by catecholamines and thrombin. J Physiol;169:82-83 P.
47. Cohan-Solal K., Debili N., Vainchenker W., Wendling F. 1999. Thrombopoetin. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. Hämostaseologie. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 36-40.
48. Collen D. 1999. The plasminogen (fibrinolytic) system. Thromb Haemost;82:259-270.
49. Corash L., Tan H., Gralnick H. R. 1977. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. Relationship between buoyant density, cell volume, and ultrastructure. Blood;49(1):71-87.
50. Corash L., Shafer B., Perlow M. 1978. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. II. Use of a subhuman primate model to analyze the relationship between density and platelet age. Blood;52(4):726-34.

-
51. Cox D. 1998. Methods for monitoring platelet function. *Am Heart J*;135(5 Pt 2 Su):S160-9.
52. Dale G. L., Friese P., Hynes L. A., Burstein S. A. 1995. Demonstration that Thiazole Orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood*;85:1822-1825.
53. Dale G. L. 1997. Platelet kinetics. *Curr Opin Hematol*;4(5):330-4.
54. Davies M. J., Thomas A. C., Knapman P. A., Hangartner J. R. 1986. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. *Circulation*;73(3):418-27.
55. Dawes J., Smith R. C., Pepper D. S. 1978. The release, distribution, and clearance of human beta-thromboglobulin and platelet factor 4. *Thromb Res*;12(5):851-61.
56. Dawson A. A., Ogston D. 1969. Exercise-induced thrombocytosis. *Acta Haematol*;42(4):241-6.
57. de Bruijne-Admiraal L. G., Modderman P. W., von dem Borne A. E. G., Sonnenberg A. 1992. P-Selectin Mediates Ca²⁺-dependent Adhesion of Activated Platelets to Many Different Types of Leukocytes: Detection by Flow Cytometry. *Blood*;80:134-142.
58. de Groot P. G., Sixma J. J. 1999. Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. *Hämostaseologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 15-26.
59. de Man F. H., Nieuwland R., van der Laarse A., Romijn F., Smelt A. H., Gevers Leuven J. A., Sturk A. 2000. Activated platelets in patients with severe hypertriglyceridemia: effects of triglyceride-lowering therapy. *Atherosclerosis*;152(2):407-14.
60. de Meirelles L. R., Mendes-Ribeiro A. C., Mendes M. A., da Silva M. N., Ellory J. C., Mann G. E., Brunini T. M. 2008. Chronic exercise reduces platelet activation in hypertension: upregulation of the l-arginine-nitric oxide pathway. *Scand J Med Sci Sports*;2008 Feb. 1 Epub ahead of print.
61. DeCaterina M., Grimaldi E., Ungaro B., Fratellanza G., Varriale V., Ciarnelli M., Scopacasa f. 2002. Effects of paraformaldehyde on platelet size and on measurement of surface IgG. *Platelets*;13:207-212.
62. Di Massimo C., Scarpelli P., Penco M., Tozzi-Ciancarelli M. G. 2004. Possible involment of plasma antioxidant defences in training-associated decrease of platelet responsiveness in humans. *Eur J Appl Physiol*;91:406-412.
63. Dickhuth H. H., Röcker K., Mayer F., Nieß A., Horstmann T., Heitkamp H. C., Dolezel P. 1996. Bedeutung der Leistungsdiagnostik und Trainingssteuerung bei Ausdauer- und Sportsportarten. *Dtsch Z Sportmed*;47:183-189.
64. Dill D. B., Costill D. L. 1974. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*;37(2):247-8.
65. Dimitriadou C., Dessypris A., Louizou C., Mandalaki T. 1977. Marathon run II: Effects on platelet aggregation. *Thromb Haemost*;37(3):451-5.
66. Dimitriu-Bona A., Burmester G. R., Waters S. J., Winchester R. J. 1983. Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic xpression on the surface of human monocytes and macrophages defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*;130:145 ff.
67. Dore M. 1998. Platelet-leukocyte interactions. *Am Heart J*;135(5 Pt 2 Su):S146-51.

68. Douste-Blazy P., Sie P., Boneu B., Marco J., Eche N., Bernadet P. 1984. Exercise-induced platelet activation in myocardial infarction survivors with normal coronary arteriogram. *Thromb Haemost*;52(3):297-300.
69. Drygas W. K. 1988. Changes in blood platelet function, coagulation, and fibrinolytic activity in response to moderate, exhaustive, and prolonged exercise. *Int J Sports Med*;9(1):67-72.
70. Dunlop L. C., Skinner M. P., Bendall L. J., Favalaro E. J., Castaldi P. A., Gorman J. J., Gamble J. R., Vadas M. A., Berndt M. C. 1992. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med*;175(4):1147-50.
71. El-Sayed M. S. 1996. Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports Med*;22(5):282-98.
72. El-Sayed M. S., Sale C., Jones P. G., Chester M. 2000. Blood hemostasis in exercise and training. *Med Sci Sports Exerc*;32(5):918-25.
73. El-Sayed M. S. 2002. Exercise and training effects on platelets in health and disease. *Platelets*;13(5-6):261-6.
74. El-Sayed M. S., Ali N., El-Sayed Ali Z. 2005. Aggregation and Activation of Blood Platelets in Exercise and Training. *Sports Med*;35(1):11-22.
75. Esmon C. T. 1989. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*;264:4743-4746.
76. Esmon C. T. 2000. Regulation of blood coagulation. *Biochemica et Biophysica Acta*;1477:349-360.
77. Evangelista V., Manarini S., Rotondo S., Martelli N., Polischuk R., McGregor J. L., de Gaetano G., Cerletti C. 1996. Platelet/Polymorphonuclear Leukocyte Interaction in Dynamic Conditions: Evidence of Adhesion Cascade and Cross Talk Between P-Selectin and the $\beta 2$ Integrin CD11b/CD18. *Blood*;88:4183-4194.
78. Evangelista V., Manarini S., Sideri R., Rotondo S., Martelli N., Piccoli A., Totani L., Piccardoni P., Vestweber D., de Gaetano G., Cerletti C. 1999. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*;93(3):876-85.
79. Faint R. W., Mackie I. J., Machin S. J. 1991. Platelet aggregation is inhibited by a nitric oxide like factor released from human neutrophils in vitro. *Br J Haematol*;71:539-545.
80. Falk E. 1985. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*;71(4):699-708.
81. Fielder P. J., Hass P., Nagel M., Stefanich E., Widmer R., Bennett G. L., Keller G. A., de Sauvage F. J., Eaton D. 1997. Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin. *Blood*;89(8):2782-8.
82. Fijnheer R., Frijns C. J., Korteweg J., Rommes H., Peters J. H., Sixma J. J., Nieuwenhuis H. K. 1997. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost*;77(6):1081-5.
83. Firor W. B., Faulkner R. A. 1988. Sudden death during exercise: how real a hazard? *Can J Cardiol*;4(6):251-4.
84. Fitzgerald D. J., Roy L., Catella F., FitzGerald G. A. 1986. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med*;315(16):983-9.

-
85. Flores N. A., Sheridan D. J. 1994. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*;28(3):295-302.
86. Foti A., Kimura S., DeQuattro V., Lee D. 1987. Liquid-chromatographic measurement of catecholamines and metabolites in plasma and urine. *Clin Chem*;33:2209-2213.
87. Fox J. E. 2001. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost*;86(1):198-213.
88. Freden K., Lundborg P., Vilen L., Kutti J. 1978. The peripheral platelet count in response to adrenergic alpha-and beta-1-receptor stimulation. *Scand J Haematol*;21(5):427-32.
89. Freedman M., Altszuler N., Karpatkin S. 1977. Presence of a nonsplenic platelet pool. *Blood*;50(3):419-25.
90. Freedman M. L., Karpatkin S. 1975. Heterogeneity of rabbit platelets. V. Preferential splenic sequestration of megathrombocytes. *Br J Haematol*;31(2):255-62.
91. Frojmovic M., Milton J. G. 1982. Human platelet size, shape, and related function in health and disease. *Physiological Reviews*;62:185-261.
92. Frojmovic M. M. 1998. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am Heart J*;135(5 Pt 2 Su):S119-31.
93. Furie B., Furie B. C., Flaumenhaft R. 2001. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*;86(1):214-21.
94. Furman M. I., Benoit S. E., Barnard M. R., Valeri C. R., Borbone M. L., Becker R. C., Hechtman H. B., Michelson A. D. 1998. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*;31(2):352-8.
95. Furman M. I., Barnard M. R., Krueger L. A., Fox M. L., Shilale E. A., Lessard D. M., Marchese P., Frelinger A. L., Goldberg R. J., Michelson A. D. 2001. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*;38:1002-1006.
96. Futterman L. G., Myerburg R. 1998. Sudden death in athletes: an update. *Sports Med*;26(5):335-50.
97. Gabriel H., Urhausen A., Kindermann W. 1992. Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*;65:164-70.
98. Gabriel H., Kindermann W. 1997. The acute immune response to exercise: what does it mean? *Int J Sports Med*;18 (Suppl 1):S28-45.
99. Gaffney P. J., Edgell T. A., Whitton C. M. 1999. The haemostatic balance - Astrup revisited. *Haemostasis*;29:58-71.
100. Gamble J. R., Skinner M. P., Berndt M. C., Vadas M. A. 1990. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP-140. *Science*;249:414-417.
101. Gawaz M., Mujais K. S., Schmidt B., Gurland H. J. 1994. Platelet-leukocyte Aggregation during hemodialysis. *Kidney Int*;46:489-495.
102. Gawaz M., Reininger A., Neumann F. J. 1996. Platelet function and platelet-leukocyte adhesion in symptomatic coronary heart disease. Effects of intravenous magnesium. *Thromb Res*;83(5):341-9.

103. Gawaz M., Neumann F. J., Dickfeld T., Koch W., Laugwitz K. L., Adelsberger H., Langenbrink K., Page S., Neumeier D., Schömig A., Brand K. 1998. Activated platelets induce secretion of monocyte chemotactic protein-1 and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*;98(1164-1171).
104. Gawaz M. 1999. Das Blutplättchen: Physiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart New York: Thieme Verlag.
105. George J. N., Pickett E. B., Saucerman S., McEver R. P., Kunicki T. J., Kieffer N., Newman P. J. 1986. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest*;78(2):340-8.
106. George J. N., Shattil S. J. 1991. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med*;324(1):27-39.
107. Gerrard J. M., Lint D., Sims P. J., Wiedmer T., Fugate R. D., McMillan E., Robertson C., Israels S. J. 1991. Identification of a Platelet Dense Granule Membrane Protein That is Deficient in a Patient With the Hermansky-Pudlak Syndrome. *Blood*;77:101-112.
108. Gonzales F., Manas M., Seiquer I., Quiles J., Mataix F. J., Huertas J. R., Martinez-Victoria E. 1996. Blood platelet function in healthy individuals of different ages. Effects of exercise and exercise conditioning. *J Sports Med Phys Fitness*;36(2):112-6.
109. Goodall A. H., de Oliveira Domingos M., Chronos N., Janes S. L., Wilson D. J. 1993. Flow cytometric detection of the redistribution of the glycoprotein Ib-IX complex on thrombin-stimulated platelets is dependent on the type of antibody conjugate used. *Blood*;81(5):1407-9.
110. Goodall A. H., J. A. 2004. Flow-cytometric analysis of platelet-membrane glycoprotein expression and platelet activation. *Methods Mol Biol*;272:225-254.
111. Göttlinger C., Mechtold B., Radbruch A. 2000. Operation of a flow cytometer. In: Radbruch A, editor. *Flow cytometry and cell sorting*. 2 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
112. Grau A. J., Ruf A., Vogt A., Lichy C., Bugge F., Patscheke H., Hacke W. 1998. Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. *Thromb Haemost*;80(2):298-301.
113. Green L. H., Seropian E., Handin R. I. 1980. Platelet activation during exercise-induced myocardial ischemia. *N Engl J Med*;302(4):193-7.
114. Haber P., Silberbauer K., Sinzinger H. 1980. Quantitative Untersuchungen über reversible Thrombozytenaggregate bei Belastung. *Schweiz Med Wochenschr*;110(41):1488-91.
115. Hagberg I. A., Roald H. E., Lyberg T. 1998. Adhesion of leukocytes to growing arterial thrombosis. *Thromb Haemost*;80:852-858.
116. Hagberg I. A., Lyberg T. 2000. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets*;11:137-50.
117. Hagberg I. A., Lyberg T. 2000. Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. *Platelets*;11(3):151-60.
118. Hambrecht R., Fiehn E., C. W., BGielen S., Hamann C., Kaiser R., Yu J., Adams V., Niebauer J., Schuler G. 1998. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*;98:2709-2715.

-
119. Hamburger S. A., McEver R. P. 1990. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*;75(3):550-4.
120. Hammoudeh A. J., Haft J. I. 1996. Coronary-plaque rupture in acute coronary syndromes triggered by snow shoveling. *N Engl J Med*;335(26):2001.
121. Harbrecht U. 1999. Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. *Hämostaseologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 27-35.
122. Harker L. A., Malpass T. W., Branson H. E., Hessel E. A., Slichter S. J. 1980. Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective α -granule release. *Blood*;56:824-834.
123. Harrison P., Robinson M. S. C., I.J. M., Machin S. J. 1997. Reticulated platelets. *Platelets*;8:379-383.
124. Hartwig J. H., DeSisto M. 1991. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol*;112:407-425.
125. Hartwig J. H. 1998. Platelet morphology. In: Loscalzo J, Schafer AI, editors. *Thrombosis and hemorrhage*. 2 ed. Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins. p. 207-228.
126. Haver V. M., Gear A. R. 1981. Functional fractionation of platelets. *J Lab Clin Med*;97(2):187-204.
127. Haziot A., Tsuberi B. Z., Goyert S. M. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- α in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*;150:5556-65.
128. Heck H., Hess G., Mader A. 1985. Vergleichende Untersuchung zu verschiedenen Laktat-Schwellenkonzepten. *Dtsch Z Sportmed*;36:19-22 u. 40-52.
129. Heilmann E., Friese P., Anderson S., George J. N., Hanson S. R., Burstein S. A., Dale G. L. 1993. Biotinylated platelets: a new approach to the measurement of platelet life span. *Br J Haematol*;85:729-735.
130. Heimpel H., Seifried E. 1999. Thrombozytenbildungs- und Verteilungsstörungen: Thrombozytosen und Thrombozytopenien. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. *Hämostaseologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 41-52.
131. Heller R., Bevers E. M. 1997. Platelets, vessel wall, and the coagulation system. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. *Platelets and their factors*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 585-617.
132. Henn V., Slupsky J. R., Grafe M., Anagnostopoulos I., Forster R., Muller-Berghaus G., Krocze R. A. 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*;391(6667):591-4.
133. Herren T., Bartsch P., Haeberli A., Straub P. W. 1992. Increased thrombin-antithrombin III complexes after 1 h of physical exercise. *J Appl Physiol*;73(6):2499-504.
134. Heyns A. D., Lotter M. G., Badenhorst P. N., van Reenen O. R., Pieters H., Minnaar P. C., Retief F. P. 1980. Kinetics, distribution and sites of destruction of 111 indium-labelled human platelets. *Br J Haematol*;44(2):269-80.
135. Hezard N., Metz D., Simon G., Droulle C., Daliphard S., Potron G. 1999. Platelet activation in cardiology: methods, indications and therapeutic perspectives. *J Mal Vasc*;24:288-293.

136. Hilberg T., Schmidt V., Lösche W., Gabriel H. H. W. 2003. Platelet activity and sensitivity to agonists after exhaustive treadmill exercise. *J Sports Sci Med*;2:15-22.
137. Hilberg T., Eichler E., Gläser D., Schmidt V., Gabriel H. H. W. 2004. Platelet activity, reactivity and platelet-leukocyte conjugate formation before and after exhaustive or moderate exercise in patients with IDDM. *Platelets*;15(2):101-108.
138. Hilberg T., Gläser D., Koksche M., Schmidt V., Soßdorf M., Gabriel H. H. W. 2004. Differentiation of platelet-leukocyte conjugate formation by short term exercise. *Clin Hemorheol Microcirc*;31.
139. Hilberg T., Menzel K., Gläser D., Zimmermann S., Gabriel H. H. W. 2007. Exercise function and platelet-leukocyte conjugate formation in untrained subjects. *Thromb Res*;Epub ahead of print (doi:10.1016/j.thrombres.2007.08.018).
140. Hiller E. 1999. Kongenitale Thrombozytopathien. In: Alexander K, Daniel WG, Diener H-W, Freund M, Köhler H, Matern S, al. e, editors. *Thiemes Innere Medizin: TIM*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag. p. 955-957.
141. Hjerdahl P. 1995. Platelet reactivity, exercise, and stable coronary artery disease. *Eur Heart J*;16(8):1017-9.
142. Hoffman M., Monroe D. M., 3rd. 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*;85(6):958-65.
143. Hollmann W., Hettinger T. 2000. *Sportmedizin: Grundlagen für Arbeit, Training und Präventivmedizin*. 4 ed. Stuttgart New York: Schattauer Verlagsgesellschaft.
144. Horstman L. L., Ahn Y. S. 1999. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*;30(2):111-42.
145. Hourdille P., Heilmann E., Combrie R., Winckler J., Clemetson K. J., Nurden A. T. 1990. Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. *Blood*;76(8):1503-13.
146. Hsu-Lin S., Berman C. L., Furie B. C., August D., Furie B. 1984. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem*;259(14):9121-6.
147. Hu H., Daleskog M., Li N. 2000. Influences of fixatives on flow cytometric measurements of platelet P-selectin expression and fibrinogen binding. *Thromb Res*;100:161-166.
148. Hughes A. S., Ilsley C. D., Wilkinson L. 1982. Platelet activation during exercise-induced myocardial ischaemia. *Thromb Res*;26(6):425-30.
149. Hurlen M., Seljeflot I., Arnesen H. 2000. Increased platelet aggregability during exercise in patients with previous myocardial infarction. Lack of inhibition by aspirin. *Thromb Res*;99(5):487-94.
150. Ikarugi H., Taka T., Nakajima S., Kato T., Ueda T., Matsumura K., al. e. 1997. Detection of a prothrombotic state after acute aerobic exercise. *Thromb Res*;85:351-356.
151. Ikarugi H., Taka T., Nakajima S., Noguchi T., Watanabe S., Sasaki Y., Haga S., Ueda T., Seki J., Yamamoto J. 1999. Norepinephrine, but not epinephrine, enhances platelet reactivity and coagulation after exercise in humans. *J Appl Physiol*;86(1):133-8.
152. Ikarugi H., Shibata M., Ishii K., Yamamoto J. 2001. Shear-induced platelet reactivity in middle-aged woman after low-intensity exercise. *Thromb Res*;104:347-351.

153. Ikkala E., Myllylä G., Sarajas H. S. 1966. Platelet adhesiveness and ADP-induced platelet aggregation in exercise. *Ann Med Exp Biol Fenn*;44(1):88-92.
154. Isenberg W. M., Bainton D. F. 1991. Megakaryocyte and platelet structure. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors. *Hematology. Basic principles and practice*. New York, NY USA: Churchill Livingstone. p. 1157-1165.
155. Italiano J. E., Shivdasani R. A. 2003. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost*;1:1174-1182.
156. Jaffe E. A. 1991. Endothelial cell structure and function. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors. *Hematology. Basic principles and practice*. New York, NY USA: Churchill Livingstone. p. 1198-1213.
157. Janes S. L., Wilson D. J., Chronos N., Goodall A. H. 1993. Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets. *Thromb Haemost*;70(4):659-66.
158. Joseph R., Riddle J. M., Welch K. M., D'Andrea G. 1989. Platelet ultrastructure and secretion in acute ischemic stroke. *Stroke*;20:1316-1319.
159. Jungersten L., Ambring A., Wall B., Wennmalm A. 1997. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol*;82:760-764.
160. Jungi T. W., Spycher M. O., Nydegger C. E., Barandun S. 1986. Platelet leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood*;67:629-636.
161. Junqueira L. C., Carneiro J. 1996. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 4. überarbeitete Auflage ed. Heidelberg: Springer-Verlag.
162. Kalafatis M., Rand M. D., Mann K. G. 1994. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*;269:31890-31880.
163. Kalafatis M., Swords N. A., Rand M. D., Mann K. G. 1994. Membran-dependent reactions in blood coagulation: role of vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*;1227:113-129.
164. Kanel R. v., Dimsdale J. E. 2000. Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis in vivo. *Eur J Haematol*;65(6):357-69.
165. Kaplar M., Kappelmayer J., Veszpremi A., Szabo K., Udvardy M. 2001. The possible association of in vivo leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets*;12(7):419-22.
166. Karpatkin S. 1969. Heterogeneity of human platelets. II. Functional evidence suggestive of young and old platelets. *J Clin Invest*;48(6):1083-7.
167. Karpatkin S. 1978. Heterogeneity of human platelets. VI. Correlation of platelet function with platelet volume. *Blood*;51(2):307-16.
168. Kasuya N., Kishi Y., Sakita S. Y., Numano F., Isobe M. 2002. Acute vigorous exercise primes enhanced NO release in human platelets. *Arteriosclerosis*;161(1):225-232.
169. Kemkes-Matthes B., Oehler G. 2001. *Blutgerinnung und Thrombose*. 3. Aufl. ed. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
170. Kestin A. S., Ellis P. A., Barnard M. R., Errichetti A., Rosner B. A., Michelson A. D. 1993. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation*;88(4 Pt 1):1502-11.

171. Kestin A. S., Valeri C. R., Khuri S. F., Loscalzo J., Ellis P. A., MacGregor H., Birjiniuk V., Ouimet H., Pasche B., Nelson M. J., et al. 1993. The platelet function defect of cardiopulmonary bypass. *Blood*;82(1):107-17.
172. Keul J., Kindermann W., Simon G. 1978. Die aerobe und anaerobe Kapazität als Grundlage für die Leistungsdiagnostik. *Leistungssport*;8:22-32.
173. Kindermann W., Simon G., Keul J. 1978. Dauertraining - Ermittlung der optimalen Trainingsherzfrequenz und Leistungsfähigkeit. *Leistungssport*;8:22-32.
174. Kindermann W., Schnabel A., Schmitt W. M., Biro G., J. C., Weber F. 1982. Catecholamines, Growth Hormone, Cortisol, Insulin, and Sex Hormones in Anaerobic and Aerobic Exercise. *Eur J Appl Physiol*;49:389 ff.
175. Kindermann W. 1987. Ergometrie - Empfehlungen für die ärztliche Praxis. *Dtsch Z Sportmed*;6:244-268.
176. Kirkpatrick U. J., Mossa M., Blann A. D., McCollum C. N. 1997. Repeated exercise induces release of soluble P-selectin in patients with intermittent claudication. *Thromb Haemost*;78(5):1138-42.
177. Kishk Y. T., Trowbridge E. A., Martin J. F. 1985. Platelet volume and count after severe prolonged physical effort. *Thromb Res*;38(4):439-42.
178. Klonizakis I., Peters A. M., Fitzpatrick M. L., Kensett M. J., Lewis S. M., Lavender J. P. 1980. Radionuclide distribution following injection of ¹¹¹Indium-labelled platelets. *Br J Haematol*;46(4):595-602.
179. Kluft C., Dooijewaard G., Emeis J. J. 1987. Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost*;13:50-68.
180. Knudsen J. B., Brodthagen U., Gormsen J., Jordal R., Norregaard-Hansen K., Paulev P. E. 1982. Platelet function and fibrinolytic activity following distance running. *Scand J Haematol*;29(5):425-30.
181. Koks M. 1997. Durchflußzytometrische Diagnostik von Thrombozyten. Krefeld: Coulter-Immunotech Dignostics.
182. Koks M. 1998. Flow cytometric analysis of platelet hypo- and hyperreagibility. In: Gutensohn K, Sonneborn H-K, Schunter F, Kühnl P, editors. *Flow cytometry in transfusion medicine. Analysis of platelets*. Heidelberg: Clin Lab Publications. p. 29-45.
183. Koks M., Woinke M. 1998. Durchflusszytometrische Thrombozytendiagnostik: Vom Labor zur klinischen Fragestellung. In. Leipzig: Coulter Immunotech.
184. Koks M., Zeiger F., Wittig K., Pfeiffer D., Ruehlmann C. 1999. Haemostatic derangement in advanced peripheral occlusive arterial disease. *Int Angiol*;18(4):256-62.
185. Kotze H. F., Heyns A. D., Wessels P., Pieters H., Badenhorst P. N., Lotter M. G. 1986. Evidence that ¹¹¹In-labelled platelets pool in the spleen, but not in the liver of normal humans and baboons. *Scand J Haematol*;37(3):259-64.
186. Kristensen S. D., Ravn H. B., Falk E. 1997. Insights into the pathophysiology of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol*;80(5A):5E-9E.
187. Kroll M. H., Sullivan R. 1998. Mechanisms of platelet activation. In: Loscalzo J, Schafer AI, editors. *Thrombosis and hemorrhage*. 2 ed. Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins. p. 261-291.
188. Kumpuris A. G., Luchi R. J., Waddell C. C., Miller R. R. 1980. Production of circulating platelet aggregates by exercise in coronary patients. *Circulation*;61(1):62-5.

-
189. Larsen E., Celi A., Gilbert G. E., Furie B. C., Erban J. K., Bonfanti R., Wagner D. D., Furie B. 1989. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*;59(2):305-12.
190. Laustiola K., Seppälä E., Nikkari T., Vapaatalo H. 1984. Exercise-induced increase in plasma arachidonic acid and thromboxane B₂ in healthy men: effect of beta-adrenergic blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*;6:449-484.
191. Lawrence M. B., Springer T. A. 1991. Leukocytes roll on a selectin surface at physiological flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*;65:859 ff.
192. Lawson J. H., Butenas S., Mann K. G. 1992. The evaluation of complex-dependent alterations in human factor VIIa. *J Biol Chem*;267:4834-4843.
193. Levine R. F., Eldor A., Shoff P. K., Kirwin S., Tenza D., Cramer E. M. 1993. Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol*;51(4):233-46.
194. Levites R., Haft J. I. 1975. Effects of exercise-induced stress on platelet aggregation. *Cardiology*;60(5):304-14.
195. Li N., Goodall A. H., Hjemdahl P. 1997. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates. *Br J Haematol*;99(4):808-16.
196. Li N., Goodall A. H., Hjemdahl P. 1999. Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. *Cytometry*;35(2):154-161.
197. Li N., Wallen N. H., Hjemdahl P. 1999. Evidence for Prothrombotic Effects of Exercise and Limited Protection by Aspirin. *Circulation*;100:1374-1379.
198. Li N., Hu H., Lindqvist M., Wikström-Jonsson E., Goodall A. H., Hjemdahl P. 2000. Platelet-Leukocyte Cross Talk in Whole Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;20:2702-2708.
199. Li N. 2008. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J Leukoc Biol*;83:January 15, e-published ahead of print.
200. Löffler G., Petrides P. E. 1998. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
201. Lorenz R. 1991. Sport und Blutgerinnung. *Praktische Sport-Traumatologie und Sportmedizin*;3:93-97.
202. Ludlam C. A., Cash J. D. 1976. Studies on the liberation of β -thromboglobulin from human platelets in vitro. *Br J Haematol*;33:239 ff.
203. Makrides S. C., Ryan U. S. 1998. Overview of the endothelium. In: Loscalzo J, Schafer AI, editors. *Thrombosis and hemorrhage*. 2 ed. Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins. p. 295-306.
204. Mann K. G., Nesheim M. E., Church W. R., Haley P., Krishnaswamy S. 1990. Surface-dependent reactions of vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*;76:1-16.
205. Mann K. G. 1994. The coagulation explosion. *Ann NY Acad Sci*;714:265-269.
206. Mann K. G. 1999. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*;82(2):165-74.

-
207. Mannucci P. M., Sharp A. A. 1967. Platelet volume and shape in relation to aggregation and adhesion. *Br J Haematol*;13(4):604-17.
208. Mant M. J., Kappagoda C. T., Quinlan J. 1984. Lack of effect of exercise on platelet activation and platelet reactivity. *J Appl Physiol*;57(5):1333-7.
209. Martin D., Carl K., Lehnertz K. 2001. *Handbuch Trainingslehre*. Schorndorf: Verlag Hofmann.
210. Mathis P. C., Wohl H., Wallach S. R., Engler R. L. 1981. Lack of release of platelet factor 4 during exercise-induced myocardial ischemia. *N Engl J Med*;304(21):1275-8.
211. Matzdorff A. C., Kuhnel G., Kemkes-Matthes B., Pralle H. 1998. Quantitative assessment of platelets, platelet microparticles, and platelet aggregates with flow cytometry. *J Lab Clin Med*;131(6):507-17.
212. McEver R. P., Beckstead J. H., Moore K. L., Marshall-Carlson L., Bainton D. F. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*;84(1):92-9.
213. McEver R. P. 1990. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells*;16(1):73-80; discussion 80-3.
214. McNicol A., Israels S. J. 1999. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res*;95(1):1-18.
215. Mehta J., Mehta P. 1982. Comparison of platelet function during exercise in normal subjects and coronary artery disease patients: Potential role of platelet activation in myocardial ischemia. *Am Heart J*;103(1):49-53.
216. Metzelaar M. J., Wijngaard P. L. J., Peters P. H., Sixma J. J., Nieuwenhuis H. K., Clevers H. C. 1991. CD63 Antigen - a novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eucaryotic cells. *J Biol Chem*;266:3239-3245.
217. Michelson A. D., Barnard M. R. 1987. Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoproteins Ib, IX, and IIb-IIIa complex. *Blood*;70(5):1673-8.
218. Michelson A. D., Ellis P. A., Barnard M. R., Matic G. B., Viles A. F., Kestin A. S. 1991. Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vivo wound. *Blood*;77(4):770-9.
219. Michelson A. D., Barnard M. R. 1993. Flow cytometric detection of the redistribution of the glycoprotein Ib-IX complex on thrombin-stimulated platelets is dependent on the type of antibody conjugate used. *Response. Blood*;81:1408-1409.
220. Michelson A. D., Barnard M. R., Benoit S. E., Mitchell J., Knowles C., Ault K. A. 1995. Characterization of platelet binding of blind panel mAb. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JW, al. e, editors. *Leucocyte Typing V*. Oxford: Springer. p. 1207-1210.
221. Michelson A. D. 1996. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*;87(12):4925-36.
222. Michelson A. D., Barnard M. R., Hechtman H. B., MacGregor H., Connolly R. J., Loscalzo J., Valeri C. R. 1996. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*;93(21):11877-82.
223. Michelson A. D., Benoit S. E., Furman M. I., al. e. 1996. Effect of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol*;270:1640-1648.

224. Michelson A. D., Benoit S. E., Furman M. I., Barnard M. R., Nurden P., Nurden A. T. 1996. The platelet surface expression of glycoprotein V is regulated by two independent mechanisms: proteolysis and a reversible cytoskeletal-mediated redistribution to the surface-connected canalicular system. *Blood*;87(4):1396-408.
225. Michelson A. D., Furman M. I. 1999. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol*;6(5):342-8.
226. Michelson A. D., Barnard M. R., Krueger L. A., Frelinger A. L., 3rd, Furman M. I. 2000. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods*;21(3):259-70.
227. Michelson A. D., Rajasekhar D., Bednarek F. J., Barnard M. R. 2000. Platelet and platelet-derived microparticle surface factor V/Va binding in whole blood: differences between neonates and adults. *Thromb Haemost*;84(4):689-94.
228. Michelson A. D., Barnard M. R., Krueger L. A., Valeri C. R., Furman M. I. 2001. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*;104(13):1533-7.
229. Mickelson J. K., Lakkis N. M., Villarreal-Levy G., Hughes B. J., Smith C. W. 1996. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*;28(2):345-53.
230. Minamino T., Kitakaze M., Sanada S., Asanuma H., Kurotobi T., Koretsune Y., Fukunami M., Kuzuya T., Hoki N., Hori M. 1998. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide. *Circulation*;98(17):1721-7.
231. Mittleman M. A., Maclure M., Tofler G. H., Sherwood J. B., Goldberg R. J., Muller J. E. 1993. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. *N Engl J Med*;329:1677-1683.
232. Miyazaki Y., Nomura S., Miyake T., Kagawa H., Kitada C., Taniguchi H., Komiyama Y., Fujimura Y., Ikeda Y., Fukuhara S. 1996. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*;88(9):3456-64.
233. Mockel M., Ulrich N. V., Rocker L., Ruf A., Klefisch F., Patscheke H., Eichstadt H., Stork T., Frei U. 1999. Exhaustive cycle exercise induces P-selectin expression, coagulation, and fibrinolysis activation in ultraendurance athletes. *Thromb Res*;94(4):263-9.
234. Mockel M., Ulrich N. V., Heller G., Jr., Rocker L., Hansen R., Riess H., Patscheke H., Stork T., Frei U., Ruf A. 2001. Platelet activation through triathlon competition in ultra-endurance trained athletes: impact of thrombin and plasmin generation and catecholamine release. *Int J Sports Med*;22(5):337-43.
235. Mores N., Martire M., Pistritto G., Volpe A. R., Menini E., Folli G., Cardillo C. 1994. Platelet alpha 2-adrenoceptors and diurnal changes of platelet aggregability in hypertensive patients. *J Hypertens*;12(8):939-45.
236. Morgenstern E. 1991. Aldehyde fixation causes membrane vesiculation during platelet exocytosis: a freeze-substitution study. *Scanning Microsc*;1991 Suppl:S109-S115.
237. Morgenstern E. 1997. Human Platelet Morphology / Ultrastructure. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. *Platelets and their factors*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 27-60.
238. Morgenstern E. 1999. Morphologie der Thrombozyten. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. *Hämostaseologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 3-14.

239. Müller-Berghaus G., Pötzsch B. 1999. Haemostaseologie. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
240. Nagata K., Tsuji T., Todoroki N., Katagiri Y., Tanoue K., Yamazaki H., Hanai N., Irimura T. 1993. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-Selectin (CD62). *J Immunol*;151:3267-3273.
241. Nemerson Y. 1992. The tissue factor pathway of blood coagulation. *Semin Hematol*;29:170-176.
242. Neumann F. J., Marx N., Gawaz M., Brand K., Ott I., Rokitta C., Sticherling C., Meinl C., May A., Schomig A. 1997. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*;95(10):2387-94.
243. Neumann G., Pfützner R., Hottenrott K. 1993. Alles unter Kontrolle - Ausdauertraining. Aachen
244. Neumann G., Gohlitz D. 1996. Trainingssteuerung im leichtathletischen Lauf mittels disziplinspezifischer Ausdauerstufentests. *Leistungssport*:63-67.
245. Nieuwenhuis H. K., van Oosterhout J. J., Rozemuller E., van Iwaarden F., Sixma J. J. 1987. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood*;70(3):838-45.
246. Nurden P., Poujol C., Nurden A. T. 1997. The evolution of megakaryocytes to platelets. *Baillieres Clin Haematol*;10(1):1-27.
247. Ohri V. C., Chatterji J. C., Das B. K., Akhtar M., Tewari S. C., Bhattacharji P., Behl A. 1983. Effect of submaximal exercise on haematocrit, platelet count, platelet aggregation and blood fibrinogen levels. *J Sports Med Phys Fitness*;23(2):127-30.
248. Oldenburg J., Brackmann H.-H. 1999. Diagnostik, Klinik und Therapie der Hämophilie A und B. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. *Hämostaseologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 185-197.
249. Ostrovsky L., King A. J., Bond S., Mitchell D., Lorant D. E., Zimmerman G. A., Larsen R., Niu X. F., Kubes P. 1998. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. *Blood*;91(8):3028-36.
250. Ott I., Neumann F. J., Gawaz M., Schmitt M., Schomig A. 1996. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*;94(6):1239-46.
251. Packham M. A. 1978. Methods for detection of hypersensitive platelets. Philadelphia, June 1977. *Thromb Haemost*;40(1):175-95.
252. Paffenbarger R. S., Jr., Hyde R. T., Wing A. L., Hsieh C. C. 1986. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med*;314(10):605-13.
253. Paffenbarger R. S., Jr., Hyde R. T., Wing A. L., Lee I. M., Jung D. L., Kampert J. B. 1993. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med*;328(8):538-45.
254. Palabrica T., Lobb R., Furie B. C., Aronovitz M., Benjamin C., Hsu Y. M., Sajer S. A., Furie B. 1992. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*;359(6398):848-51.
255. Pan Y.-Z., Wu B.-M., Hong X.-S. 1994. The clinical significance of platelet activation during exercise-induced myocardial ischemia. *Zhong Hua Nei Ke Zha Zhi*;33:106-108.

256. Parizkova J. 1962. Rozvoj aktivni hmoty a tuku u deti a mladeje. S Z N.
257. Patrono C., Ciabattini G., Pugliese F., Pierucci A., Blair I. A., FitzGerald G. A. 1986. Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *J Clin Invest*;77(2):590-4.
258. Paulus J. M. 1975. Platelet size in man. *Blood*;46(3):321-36.
259. Peerschke E. I. B., Lopez J. A. 1998. Platelet membranes and receptors. In: Loscalzo J, Schafer AI, editors. *Thrombosis and hemorrhage*. 2 ed. Baltimore, Maryland USA: Williams & Wilkins. p. 229-260.
260. Pegrum G. D., Harrison K. M., Shaw S., Haselton A., Wolff S. 1967. Effect of prolonged exercise on platelet adhesiveness. *Nature*;213(73):301-2.
261. Pekkanen J., Marti B., Nissinen A., Tuomilehto J., Punsar S., Karvonen M. J. 1987. Reduction of premature mortality by high physical activity: a 20-year follow-up of middle-aged Finnish men. *Lancet*;1(8548):1473-7.
262. Penington D. G., Streatfield K., Roxburgh A. E. 1976. Megakaryocytes and the heterogeneity of circulating platelets. *Br J Haematol*;34(4):639-53.
263. Peters A. M., Klonizakis I., Lavender J. P., Lewis S. M. 1980. Use of ¹¹¹Indium-labeled platelets to measure spleen function. *Br J Haematol*;46(4):587-93.
264. Peyton B. D., Rohrer M. J., Furman M. I., Barnard M. R., Rodino L. J., Benoit S. E., Hechtman H. B., Valeri C. R., Michelson A. D. 1998. Patients with venous stasis ulceration have increased monocyte-platelet aggregation. *J Vasc Surg*;27(6):1109-15; discussion 1115-6.
265. Piret A., Niset G., Depiesse E., Wyns W., Boeynaems J. M., Poortmans J., Degre S. 1990. Increased platelet aggregability and prostacyclin biosynthesis induced by intense physical exercise. *Thromb Res*;57(5):685-95.
266. Plow E. F., Ginsberg M. H. 1991. The molecular basis of platelet function. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors. *Hematology. Basic principles and practice*. New York, NY USA: Churchill Livingstone. p. 1165-1176.
267. Prentice C. R., Hassanein A. A., McNicol G. P., Douglas A. S. 1972. Studies on blood coagulation, fibrinolysis and platelet function following exercise in normal and splenectomized people. *Br J Haematol*;23(5):541-52.
268. Radbruch A. 1994. Immunfluoreszenz: Färbung - Messung - Datenauswertung. In: Schmitz G, Rothe G, editors. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart New York: Schattauer Verlagsgesellschaft. p. 53-61.
269. Radbruch A. 2000. Immunofluorescence: Basic considerations. In: Radbruch A, editor. *Flow cytometry and cell sorting*. 2 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag.
270. Raffael A., Nebe C. T., Valet G. 1994. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G, editors. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart New York: Schattauer Verlagsgesellschaft. p. 3-49.
271. Rapaport S. I. 1991. The extrinsic pathway inhibitor: A regulator of tissue factor-dependent blood coagulation. *Thromb Haemost*;66:6-15.
272. Rauch U., Ziegler D., Piolot R., Schwippert B., Benthake H., Schultheiss H. P., Tschoepe D. 1999. Platelet activation in diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabet Med*;16(10):848-52.
273. Rauramaa R., Li G., Vaisanen S. B. 2001. Dose-response and coagulation and hemostatic factors. *Med Sci Sports Exerc*;33(6 Suppl):S516-20; discussion S528-9.

274. Redlich H., Vickers J., Lösche W., Heptinstall S., Kehrel B., Spangenberg P. 1997. Formation of platelet-leukocyte conjugates in whole blood. *Platelets*;8:419-425.
275. Reininger C. B., Graf J., Reininger A. J., Spannagl M., Steckmeier B., Schweiberer L. 1996. Increased platelet and coagulatory activity indicate ongoing thrombogenesis in peripheral arterial disease. *Thromb Res*;82:523-532.
276. Rinder C. S., Bonan J. L., Rinder H. M., Mathew J., Hines R., Smith B. R. 1992. Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood*;79(5):1201-5.
277. Rinder H. M., Bonan J. L., Rinder C. S., Ault K. A., Smith B. R. 1991. Dynamics of Leukocyte-Platelet Adhesion in Whole Blood. *Blood*;78:1730-1737.
278. Rinder H. M., Bonan J. L., Rinder C. S., Ault K. A., Smith B. R. 1991. Activated and Unactivated Platelet Adhesion to Monocytes and Neutrophils. *Blood*;78:1760-1769.
279. Ritchie J. L., Alexander H. D., Rea I. M. 2000. Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood--methodological considerations. *Clin Lab Haematol*;22(6):359-63.
280. Rocker L., Drygas W. K., Heyduck B. 1986. Blood platelet activation and increase in thrombin activity following a marathon race. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*;55(4):374-80.
281. Rocker L., Mockel M., Westpfahl K. P., Gunga H. C. 1996. Influence of maximal ergometric exercise on endothelin concentrations in relation to molecular markers of the hemostatic system. *Thromb Haemost*;75(4):612-6.
282. Roessner A., Kirkpatrick C. J., Schneider J. 2001. Gefäße. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, editors. *Pathologie*. 2 ed. München Jena: Urban & Fischer. p. 465-479.
283. Ronni-Sivula H., Malm H., Ylikorkala O., Viinikka L. 1993. Marathon run stimulates more prostacyclin than thromboxan synthesis and differently in men and women. *Prostaglandins*;46:75-79.
284. Rosenberg R. D., Rosenberg J. S. 1984. Natural anticoagulant mechanisms. *J Clin Invest*;74:1-6.
285. Rost R., Hollmann W. 1982. *Belastungsuntersuchungen in der Praxis*. Stuttgart New York: Thieme Verlag.
286. Rotmensch H. H., Vlasses P. H., Carpenter K. L., D'Amelio L. F., Swanson B. N., Ferguson R. K. 1983. Plasma platelet products and exercise-induced myocardial ischemia. *J Lab Clin Med*;102(1):63-9.
287. Ruf A., Patscheke H. 1995. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost*;21(2):146-51.
288. Ruf A., Frojmovic M. M., Patscheke H. 1997. Platelet aggregation. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. *Platelets and their factors*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 83-98.
289. Sakariassen K. S., Holme P. A., Orvim U., Barstad R. M., Solum N. O., Brosstad F. R. 1998. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation in native human blood. *Thromb Res*;92(6 Suppl 2):S33-41.
290. Sano T., Motomiya T., Yamazaki H. 1980. Platelet release reaction in vivo in patients with ischaemic heart disease after isometric exercise and its prevention with dipyridamole. *Thromb Haemost*;42(5):1589-97.

291. Schernthaner G., Muhlhauser I., Bohm H., Seebacher C., Laimer H. 1983. Exercise induces in vivo platelet activation in patients with coronary artery disease and in healthy individuals. *Haemostasis*;13(6):351-7.
292. Schmidt K. G., Rasmussen J. W. 1984. Exercise-induced changes in the in vivo distribution of ¹¹¹In-labelled platelets. *Scand J Haematol*;32(2):159-66.
293. Schmidt K. G., Rasmussen J. W. 1984. Are young platelets released in excess from the spleen in response to short-term physical exercise? *Scand J Haematol*;32(2):207-14.
294. Schmidt K. G., Rasmussen J. W., Rasmussen A. D. 1985. Kinetics of ¹¹¹In-labelled platelets in healthy subjects. *Scand J Haematol*;34(5):370-7.
295. Schmidt R. F., Thews G. 1997. *Physiologie des Menschen*. 27. Auflage ed. Berlin Heidelberg New-York
296. Schmidt V., Hilberg T. 2006. ThromboFix Platelet Stabilizer: Advances in clinical platelet analyses by flow cytometry? *Platelets*;17 (4):266-273.
297. Schmitz G., Rothe G., Ruf A., Barlage S., Tschope D., Clemetson K. J., Goodall A. H., Michelson A. D., Nurden A. T., Shankey T. V. 1998. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost*;79(5):885-96.
298. Schultheiss H. P., Tschoepe D., Esser J., Schwippert B., Roesen P., Nieuwenhuis H. K., Schmidt-Soltan C., Strauer B. 1994. Large platelets continue to circulate in an activated state after myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*;24(4):243-7.
299. Schwartz C. J., Ardlie N. G. 1967. Catecholamines and platelet aggregation. *Circ Res*;21 Suppl:187-201.
300. Shalev A., Michaud g., Israels S. J., McNicol A., Singhroy S., McMillan E., White J. G., Witkop C. J., Nichols W. L., Greenberg A. H., Gerrard J. M. 1992. Quantification of a Novel Dense Granule Protein (Granulophysin) in Platelets of Patients With Dense Granule Storage Pool Deficiency. *Blood*;80:1231-1237.
301. Shattil S. J., Hoxie J. A., Cunningham M., Brass L. F. 1985. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*;260(20):11107-14.
302. Shattil S. J., Cunningham M., Hoxie J. A. 1987. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*;70(1):307-15.
303. Shimizu M., Ando Y., Takei M., Miyachi H., Tanaka Y., Kawada T. 2001. Whole blood flow cytometry for detection of activated platelets. I. Platelet identification, blood collection and storage. *Rinsho Byori*;49:402-407.
304. Shulman N. R., Watkins S. P., Jr., Itscoitz S. B., Students A. B. 1968. Evidence that the spleen retains the youngest and hemostatically most effective platelets. *Trans Assoc Am Physicians*;81:302-13.
305. Siess W., Lorenz R., Roth P., Weber P. C. 1982. Plasma catecholamines, platelet aggregation and associated thromboxane formation after physical exercise, smoking or norepinephrine infusion. *Circulation*;66(1):44-8.
306. Sinzinger H., Rodrigues M. 1997. Platelets and the vascular system: atherosclerosis, thrombosis, myocardial infarction. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. *Platelets and their factors*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 563-583.

307. Siscovick D. S., Weiss N. S., Fletcher R. H., Lasky T. 1984. The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. *N Engl J Med*;311(14):874-7.
308. Spangenberg P., Redlich H., Bergmann I., Lösche W., Götzrath M., Kehrel B. 1993. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost*;70:514-21.
309. Stegmann H., Kindermann W. 1981. Bestimmung der individuellen anaeroben Schwelle bei unterschiedlichen Ausdauertrainierten aufgrund des Verhaltens der Lactatkinetik während der Arbeits- und Erholungsphase. *Dtsch Z Sportmed*;32:213-221.
310. Stenberg P. E., McEver R. P., Shuman M. A., Jacques Y. V., Bainton D. F. 1985. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*;101(3):880-6.
311. Storey R. F., Heptinstall S. 1999. Laboratory investigation of platelet function. *Clin Lab Haematol*;21:317-329.
312. Strano A., Davi G., Patrono C. 1991. In vivo platelet activation in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost*;17(4):422-5.
313. Stratton J. R., Malpass T. W., Ritchie J. L., Pfeifer M. A., Harker L. A. 1982. Studies of platelet factor 4 and beta thromboglobulin release during exercise: lack of relationship to myocardial ischemia. *Circulation*;66(1):33-43.
314. Strobel G., Friedmann B., Siebold R., Bärtsch P. 1999. Effect of severe exercise on plasma catecholamines in differently trained athletes. *Med Sci Sports Exerc*;31:560-565.
315. Thews A. 1997. Einführung in die Durchflußzytometrie und ihre Anwendung. Krefeld: Coulter-Immunotech Diagnostics.
316. Thews A. 1997. Durchflußzytometrische Bestimmung des Immunstatus unter Berücksichtigung der Qualitätssicherung. Krefeld: Coulter-Immunotech Diagnostics.
317. Thomas L. 1998. Labor und Diagnose. Dade Behring Sonderausgabe ed. Frankfurt/Main: TH-Book verlagsgesellschaft.
318. Thompson C. B., Eaton K. A., Princiotta S. M., Rushin C. A., Valeri C. R. 1982. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol*;50(3):509-19.
319. Thompson C. B., Love D. G., Quinn P. G., Valeri C. R. 1983. Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood*;62(2):487-94.
320. Thompson C. B., Jakubowski J. A., Quinn P. G., Deykin D., Valeri C. R. 1984. Platelet size and age determine platelet function independently. *Blood*;63(6):1372-5.
321. Todd M. K., Goldfarb A. K., Kaufman R. D., Burleson C. 1994. Combined effects of age and exercise on thromboxane B₂ and platelet activation. *J Appl Physiol*;76:1548-1552.
322. Todd R. F., Nadler L. M., Schlossman S. F. 1981. Antigens on human monocytes identified by monoclonal Antibodies. *J Immunol*;126:1435-42.
323. Tofler G. H., Brezinski D., Schafer A. I., Czeisler C. A., Rutherford J. D., Willich S. N., Gleason R. E., Williams G. H., Muller J. E. 1987. Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. *N Engl J Med*;316(24):1514-8.
324. Tokuue J., Hayashi J., Hata Y., Nakahara K., Ikeda Y. 1996. Enhanced platelet aggregability under high shear stress after treadmill exercise in patients with effort angina. *Thromb Haemost*;75(5):833-7.

325. Tschoepe D., Roesen P., Esser J., Schwippert B., Nieuwenhuis H. K., Kehrel B., Gries F. A. 1991. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost*;17:433-438.
326. Tschoepe D., Schultheiss H. P., Kolarov P., Schwippert B., Dannehl K., Nieuwenhuis H. K., Kehrel B., Strauer B., Gries F. A. 1993. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation*;88(1):37-42.
327. Tschoepe D. 1994. Markeranalyse und Funktionstests an Thrombozyten. In: Schmitz G, Rothe G, editors. *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart New York: Schattauer Verlagsgesellschaft. p. 429-431.
328. Tschoepe D., Schwippert B. 1997. Platelet flow cytometry - adhesiv proteins. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. *Platelets and their factors*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 619-643.
329. Ulutin T., Sonmez H., Ucisik N., Suer S., Bayram C., Kokoglu E., Sultuybek G. 1997. The molecular markers of hemostatic activation on coronary artery disease. *Thromb Res*;88(3):329-32.
330. Urhausen A., Kindermann W. 1998. Der plötzliche Herztod im Sport. *Ther Umsch*;55(4):229-34.
331. Vilen L., Freden K., Kutti J. 1980. Presence of a non-splenic platelet pool in man. *Scand J Haematol*;24(2):137-41.
332. Wadenvik H., Kutti J. 1987. The effect of an adrenaline infusion on the splenic blood flow and intrasplenic platelet kinetics. *Br J Haematol*;67(2):187-92.
333. Wagner C. T., Kroll M. H., Chow T. W., Hellums J. D., Schafer A. I. 1996. Epinephrine and shear stress synergistically induce platelet aggregation via a mechanism that partially bypasses VWF-GP IB interactions. *Biorheology*;33(3):209-29.
334. Wahba A., Black G., Kokschi M., Rothe G., Preuner J., Schmitz G., Birnbaum D. E. 1996. Cardiopulmonary bypass leads to a preferential loss of activated platelets. A flow cytometric assay of platelet surface antigens. *Eur J Cardiothorac Surg*;10(9):768-73.
335. Wallen N. H., Goodall A. H., Li N., Hjemdahl P. 1999. Activation of haemostasis by exercise, mental stress and adrenaline: effects on platelet sensitivity to thrombin and thrombin generation. *Clin Sci*;97:27-35.
336. Walther C., Hambrecht R. 2001. Endotheliale Dysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen: Einfluss von körperlicher Aktivität. *Deut Z Sportmed*;52:215-220.
337. Wang J. S., Jen C. J., Kung H. C., Lin L. J., Hsiue T. R., Chen H. I. 1994. Different effects of strenuous exercise and moderate exercise on platelet function in men. *Circulation*;90(6):2877-85.
338. Wang J. S., Jen C. J., Chen H. I. 1995. Effects of exercise training and deconditioning on platelet function in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;15(10):1668-74.
339. Wang J. S., Jen C. J., Chen H. I. 1997. Effects of chronic exercise and deconditioning on platelet function in woman. *J Appl Physiol*;83:2080-2085.
340. Wang J. S., Cheng L. J. 1999. Effect of strenuous, acute exercise on alpha2-adrenergic agonist-potentiated platelet activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;19(6):1559-65.
341. Wang J. S., Yen H. L., Yang C. M. 2006. Warm-up exercise suppresses platelet-eosinophil/neutrophil aggregation and platelet-promoted release of eosinophil/neutrophil oxidant products enhanced by severe exercise in men. *Thromb Haemost*;95:490-498.

342. Wang J.-S. 2004. Intense exercise increases shear-induced platelet aggregation in men through enhancement of von Willbrand factor binding, glycoprotein IIb/IIIa activation, and P-selectin expression on platelets. *Eur J Appl Physiol*;91:741-747.
343. Wang J.-S., Liao C. H. 2004. Moderate-intensity exercise suppresses platelet activation and polymorphonuclear leukocyte interaction with surface-adherent platelets under shear flow in men. *Thromb Haemost*;91(3):587-594.
344. Wang J.-S. 2006. Exercise prescription and thrombogenesis. *J Biomed Sci*;13:753-761.
345. Warlow C. P., Ogston D. 1974. Effect of exercise on platelet count, adhesion, and aggregation. *Acta Haematol*;52(1):47-52.
346. Weineck J. 2002. Optimales Training - Leistungsphysiologische Trainingslehre unter besonderer Berücksichtigung des Kinder- und Jugendtrainings. 12. Auflage ed. Erlangen: Spitta Verlag.
347. Weiss C., Jelkmann W. 1997. Funktionen des Blutes. In: Schmidt RF, Thews G, editors. *Physiologie des Menschen*. 27. ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 411-447.
348. Weiss C., Seitel G., Bartsch P. 1998. Coagulation and fibrinolysis after moderate and very heavy exercise in healthy male subjects. *Med Sci Sports Exerc*;30(2):246-51.
349. Wendling F., Vainchenker W. 1998. Thrombopoietin and its receptor. *Eur Cytokine Netw*;9(3):221-31.
350. White J. G. 1994. Platelets and arteriosclerosis. *E J Clin Invest*;24:25-29.
351. White J. G., Burris S., Escolar G. 1999. Influence of thrombin in suspension, surface activation, and high shear on platelet surface GPIb/IX distribution. *J Lab Clin Med*;133(3):245-52.
352. Willich S. N., Lewis M., Lowel H., Arntz H. R., Schubert F., Schroder R. 1993. Physical exertion as a trigger of acute myocardial infarction. Triggers and Mechanisms of Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med*;329(23):1684-90.
353. Wong C. S., Gamble J. R., Skinner M. P. 1991. Adhesion protein GMP 140 inhibits superoxide anion release by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*;88:2397-2401.
354. Wu K. K., Hoak J. C. 1974. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet*;2(7886):924-6.
355. Wu K. K., Hoak J. C. 1975. Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. *Stroke*;6(5):521-4.
356. Yegutkin G. G., Samburski S. S., Mortensen S. P., Jalkanen S., Gonzalez-Alonso J. 2007. Intravascular ADP and soluble nucleotidases contribute to acute prothrombotic state during vigorous exercise in humans. *J Physiol*;579.2:553-564.
357. Yilmaz M. B., Saricam E., Biyikoglu S. F., Guray Y., Guray U., Korkmaz S. 2004. Mean Platelet Volume and Exercise Stress Test. *J Thromb Thrombolysis*;17(2):115-34.
358. Zanten G. H. v., Groot P. G. d., Sixma J. J. 1997. Platelet adhesion. In: Bruchhausen Fv, Walter U, editors. *Platelet and their factors*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag. p. 61-81.
359. Zintl F. 1988. *Ausdauertraining - Grundlagen, Methoden, Trainingssteuerung*. München

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| ATIII | Antithrombin III |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BSA | Bovin Serum Albumin |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CD14 | Rezeptor für Lipopolysaccharide auf Monozyten |
| CD41 | Glycoprotein IIb Untereinheit des Fibrinogenrezeptor Komplex |
| CD42b | Glykoprotein Iba Untereinheit des von-Willebrand-Faktor Rezeptor Komplex |
| CD45 | Panleukozytenmarker |
| CD62P | P-Selektin (Membranprotein der α -Granula) |
| CD63 | Granulophysin (Membranprotein der dichten Granula) |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| ECD | Phycoerythrin-Texas Red [®] -x |
| EDRF | endothelium derived relaxing factor (NO) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| GMP-140 | Glycomembranprotein 140, identisch mit P-Selektin |
| GP | Glykoprotein |
| GP Ib-V-IX | von-Willebrand-Faktor Rezeptor Komplex |
| GP IIb-IIIa | Fibrinogenrezeptor Komplex |
| GPRP | Glycin-Prolin-Arginin-Prolin-NH ₂ |
| HMK | hochmolekulares Kininogen |
| IAS | individuelle anaerobe Schwelle |
| LOD | Laktatoxidase |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| MPV | mittleres Plättchenvolumen (mean platelet volume) |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| mM | millimolar (1×10^{-3} mol/l) |
| μ M | mikromolar (1×10^{-6} mol/l) |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PAC-1 | monoklonaler Antikörper, erkennt den aktivierten Fibrinogenrezeptor |

| | |
|---------------------|---|
| PAR | platelet aggregate ratio |
| PC5 | Phycoerythrin-cyanin 5.1 |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PBS | Phosphatpuffer |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| Quick | Thromboplastinzeit |
| RGDS | Arginin-Glycin-Aspartat-Serin-NH ₂ |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| SCS | surface-connected canalicular system |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| Tab. | Tabelle |
| TF | Tissue factor (Gewebsthromboplastin) |
| TRAP-6 | thrombin receptor activating peptide 6 |
| TxA ₂ | Thromboxan A ₂ |
| VO ₂ max | maximale Sauerstoffaufnahme |
| vWF | von Willebrand Faktor |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Überblick über den Ablauf der Hämostase | 8 |
| Abbildung 2: Aktivierung von Thrombozyten | 16 |
| Abbildung 3: Testprotokoll Stufentest | 27 |
| Abbildung 4: Bestimmung individuellen anaeroben Schwelle (IAS) | 28 |
| Abbildung 5: Belastungsprotokoll 90-Sekunden Test | 32 |
| Abbildung 6: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung | 38 |
| Abbildung 7: messbare Zelleigenschaften | 38 |
| Abbildung 8: Strahlengang einer 4-Farbanalyse eines Durchflusszytometers | 39 |
| Abbildung 9: Detektion der Thrombozyten aus dem Vollblut | 43 |
| Abbildung 10: Validierung der Thrombozyten | 44 |
| Abbildung 11: Auswertung mittlere Fluoreszenzintensität | 44 |
| Abbildung 12: Auswertung nach % positiven Zellen | 45 |
| Abbildung 13: Detektion der Leukozyten aus dem Vollblut | 48 |
| Abbildung 14: Auswertung Konjugate | 48 |
| Abbildung 15: immunologische Differenzierung der Leukozyten | 51 |
| Abbildung 16: MFI für CD41-PE und CD42b-PE Laufband-Stufentest | 57 |
| Abbildung 17: Thrombozytenaktivität CD62P Laufband-Stufentest | 58 |
| Abbildung 18: Thrombozytenaktivität PAC-1 Laufband-Stufentest | 60 |
| Abbildung 19: Thrombozytenaktivität CD62P und PAC-1 Wärmebad | 61 |
| Abbildung 20: Thrombozytenreaktivität CD41 und CD62P Rad-Stufentest | 63 |
| Abbildung 21: Thrombozytenreaktivität CD42b und PAC-1 Rad-Stufentest | 64 |
| Abbildung 22: Stabilität CD62P und PAC-1 unstimuliert | 65 |
| Abbildung 23: Stabilität CD62P nach Stimulation unfixiert | 65 |
| Abbildung 24: Thrombozytenaktivität Dauertest | 67 |
| Abbildung 25: Thrombozytenreaktivität Dauertest | 68 |
| Abbildung 26: Thrombozyten-Leukozyten Konjugate Dauertest | 69 |
| Abbildung 27: Thrombozytenaktivität nach Erythrozytenlyse | 69 |
| Abbildung 28: Stabilität Konjugate | 70 |
| Abbildung 29a: Thrombozytenaktivität (CD41/CD62P) 90-Sekunden Test | 74 |
| Abbildung 29b: Thrombozytenreaktivität (CD41/CD62P) 90-Sekunden Test | 74 |
| Abbildung 30: Thrombozytenaktivität CD63 90-Sekunden Test | 75 |
| Abbildung 31: Konjugate 90-Sekunden Test | 76 |
| Abbildung 32: MFI CD41-PE Konjugate 90-Sekunden Test | 77 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 33: Stabilität Konjugate nach Differenzierung | 78 |
| Abbildung 34: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Rosettenformation | 105 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: anthropometrische Daten der Studienteilnehmer | 34 |
| Tabelle 2: Ergebnisse der Leistungsbeurteilungen | 34 |
| Tabelle 3: Intra- und Intertestvariabilität Durchflusszytometrie | 46 |
| Tabelle 4: Ergometrieergebnisse Stufentest | 54 |
| Tabelle 5: Katecholamine Stufentest | 55 |
| Tabelle 6: Thrombozytenzahl und mittleres Thrombozytenvolumen Stufentest | 56 |
| Tabelle 7: Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht | 56 |
| Tabelle 8: lösliches P-Selektin | 61 |
| Tabelle 9: Thrombozytenreaktivität Laufband-Stufentest | 62 |
| Tabelle 10: Ergometrieergebnisse Dauertest | 66 |
| Tabelle 11: Thrombozytenzahl, mittleres Thrombozytenvolumen und Differentialblutbild Dauertest | 67 |
| Tabelle 12: Laktat 90-Sekunden Test | 71 |
| Tabelle 13: Katecholamine 90-Sekunden Test | 72 |
| Tabelle 14: Thrombozytenzahl, mittleres Thrombozytenvolumen und Differentialblutbild 90-Sekunden Test | 73 |

Anhang

Rohdaten Teilstudie I:

| | |
|--|-----|
| anthropometrische Daten | 139 |
| Ergebnisse Leistungsbeurteilung | 139 |
| Ergometriedaten | 140 |
| Katecholamine | 141 |
| Thrombozytenzahl | 142 |
| mittleres Thrombozytenvolumen | 143 |
| Vorwärtsstreulicht | 144 |
| Seitwärtsstreulicht | 145 |
| mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE unstimuliert | 146 |
| mittlere Fluoreszenzintensität CD42b-PE unstimuliert | 147 |
| CD62P unstimuliert | 148 |
| PAC-1 unstimuliert | 149 |
| Negativkontrollen | 150 |
| Thrombozytenaktivität Wärmebad | 151 |
| lösliches P-Selektin | 152 |
| Thrombozytenreaktivität CD62P Laufband-Stufentest | 153 |
| Thrombozytenreaktivität PAC-1 Laufband-Stufentest | 154 |
| Thrombozytenreaktivität CD41/CD62P Rad-Stufentest | 155 |
| Thrombozytenreaktivität CD42b/PAC-1 Rad-Stufentest | 156 |
| Probenstabilität | 157 |

Rohdaten Teilstudie II:

| | |
|---|-----|
| anthropometrische Daten | 158 |
| Ergebnisse Leistungsbeurteilung | 158 |
| Ergometriedaten | 159 |
| Thrombozytendaten | 159 |
| Blutbildveränderungen | 160 |
| Thrombozytenaktivität | 161 |
| Thrombozytenreaktivität | 161 |
| Thrombozyten-Leukozyten Konjugate | 162 |
| Thrombozytenaktivität nach Erythrozytenlyse | 162 |
| Probenstabilität Konjugate | 162 |

Rohdaten Teilstudie III:

| | |
|---|-----|
| anthropometrische Daten | 163 |
| Ergebnisse Leistungsbeurteilung | 163 |
| Laktatwerte | 164 |
| Adrenalin | 165 |
| Noradrenalin | 166 |
| Thrombozytenzahl | 167 |
| mittleres Thrombozytenvolumen | 168 |
| Leukozyten | 169 |
| Granulozyten | 170 |
| Monozyten | 171 |
| Lymphozyten | 172 |
| Thrombozytenaktivität % CD62P positive Zellen | 173 |
| Thrombozytenaktivität MFI CD41-PE | 174 |
| Thrombozytenaktivität % CD63 positive Zellen | 175 |
| Thrombozytenreaktivität % CD62P positive Zellen | 176 |

| | |
|---|-----|
| Thrombozytenreaktivität MFI CD41-PE | 177 |
| Granulozyten-Thrombozyten Konjugate in % | 178 |
| Monozyten-Thrombozyten Konjugate in % | 179 |
| Lymphozyten-Thrombozyten Konjugate in % | 180 |
| Granulozyten-Thrombozyten Konjugate MFI CD41-PE | 181 |
| Monozyten-Thrombozyten Konjugate MFI CD41-PE | 182 |
| Lymphozyten-Thrombozyten Konjugate MFI CD41-PE | 183 |
| Probenstabilität Konjugate | 184 |

Rohdaten Teilstudie I

| Probanden | Teilstudie I: anthropometrische Daten | | | | |
|-------------------|---------------------------------------|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| | Alter [Jahre] | Größe [cm] | Gewicht [kg] | Körperfett [%] | rel. Herzvolumen [ml/kg] |
| 1 | 22 | 187 | 63 | 6,1 | 13,1 |
| 2 | 24 | 186 | 86 | 9,8 | 11,4 |
| 3 | 21 | 182 | 69 | 1,0 | 11,9 |
| 4 | 24 | 175 | 58 | 6,8 | 14,0 |
| 5 | 24 | 177 | 81 | 9,5 | 11,3 |
| 6 | 23 | 176 | 70 | 11,4 | 11,3 |
| 7 | 23 | 173 | 64 | 9,4 | 12,4 |
| 8 | 27 | 178 | 78 | 8,2 | 12,8 |
| 9 | 20 | 176 | 64 | 7,4 | 12,6 |
| 10 | 21 | 184 | 76 | 14,6 | 8,1 |
| 11 | 22 | 184 | 77 | 12,3 | 12,6 |
| 12 | 21 | 197 | 86 | 6,0 | 13,6 |
| 13 | 24 | 179 | 70 | 9,4 | 11,4 |
| Mittelwert | 23 | 181 | 72 | 9,4 | 12,0 |
| StAbw. | ±2 | ±7 | ±9 | ±2,6 | ±1,5 |

| Probanden | Teilstudie I: Ergebnisse Leistungsbeurteilung | | | | | |
|-------------------|---|-------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|
| | P _{max} [W] | IAS [W] | VO2 _{max} [ml/min] | rel. VO2 _{max} [ml/min/kg] | Laktat _{max} [mmol/l] | HF _{max} [1/min] |
| 1 | 325 | 223 | 3893 | 61,8 | 13,8 | 201 |
| 2 | 350 | 243 | 5246 | 61,0 | 13,0 | 194 |
| 3 | 267 | 150 | 3878 | 56,2 | 10,5 | 197 |
| 4 | 250 | 178 | 3335 | 57,5 | 10,8 | 196 |
| 5 | 383 | 317 | 5508 | 68,0 | 7,1 | 182 |
| 6 | 350 | 240 | 4060 | 58,0 | 12,7 | 184 |
| 7 | 261 | 204 | 3571 | 55,8 | 8,7 | 196 |
| 8 | 350 | 267 | 4735 | 60,7 | 9,5 | 175 |
| 9 | 367 | 253 | 4288 | 67,0 | 11,1 | 201 |
| 10 | 250 | 160 | 3359 | 44,2 | 12,1 | 201 |
| 11 | 344 | 235 | 4458 | 57,9 | 13,3 | 195 |
| 12 | 417 | 334 | 5762 | 67,0 | 8,7 | 188 |
| 13 | 269 | 150 | 3710 | 53,0 | 12,8 | 185 |
| Mittelwert | 322 | 227 | 4290 | 59,1 | 11,1 | 191 |
| StAbw. | ± 56 | ± 59 | ± 8 10 | ± 6,5 | ± 2,1 | ± 9 |

| | Teilstudie I: Ergometriedaten | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Herzfrequenz [min-1] | | Laktat [mmol/l] | | Dauer | P _{max} | P _{IAS} |
| | Ruhe | Max. | Ruhe | Max. | [min] | [Watt bzw. m/s] | |
| | Stufentest Laufband | | | | | | |
| 1 | 87 | 201 | 0,84 | 12,35 | 21:00 | 5,0 | 3,78 |
| 2 | 70 | 194 | 1,1 | 10,53 | 18:00 | 4,5 | 3,32 |
| 3 | 92 | 197 | / | / | 19:35 | 4,77 | |
| 4 | 58 | 196 | 0,87 | 11,5 | 19:00 | 4,67 | 3,63 |
| 5 | 66 | 182 | 1,13 | 7,44 | 18:00 | 4,5 | 3,42 |
| 6 | 60 | 184 | 1,02 | 9,37 | 19:30 | 4,75 | 3,65 |
| 7 | 73 | 196 | 1,05 | 9,56 | 20:15 | 4,89 | 3,62 |
| 8 | 47 | 175 | 1,5 | 6,88 | 21:00 | 5,0 | 4,15 |
| 9 | 52 | 201 | 1,19 | 11,49 | 25:30 | 5,75 | 4,85 |
| 10 | 96 | 209 | 1,26 | 13,61 | 14:15 | 3,87 | 2,75 |
| 11 | 55 | 195 | 0,98 | 13,88 | 21:00 | 5,0 | 3,67 |
| 12 | 63 | 188 | 1,21 | 10,82 | 22:00 | 5,17 | 4,18 |
| 13 | 74 | 185 | 1,47 | 12,31 | 19:15 | 4,71 | 3,72 |
| Mittelwert ± StAbw. | 68,7 ± 15,4 | 192,5 ± 9,3 | 1,1 ± 0,2 | 10,8 ± 2,2 | 19:53 ± 2:35 | 4,8 ± 0,4 | 3,7 ± 0,5 |
| | Stufentest Fahrrad | | | | | | |
| 1 | 84 | 196 | 1,14 | 12,33 | 19:24 | 323 | 223 |
| 2 | 65 | 193 | 0,91 | 13,34 | 21:00 | 350 | 243 |
| 3 | 72 | 189 | 1,73 | 10,59 | 16:00 | 267 | 150 |
| 4 | 58 | 187 | 0,58 | 13,14 | 15:00 | 250 | 178 |
| 5 | 58 | 186 | 1,42 | 9,91 | 24:00 | 400 | 317 |
| 6 | 66 | 185 | 1,74 | 13,01 | 21:00 | 350 | 240 |
| 7 | 59 | 179 | 1,22 | 10,03 | 15:00 | 250 | 204 |
| 8 | 54 | 165 | 1,15 | 11,19 | 20:45 | 346 | 267 |
| 9 | 60 | 200 | 1,13 | 11,87 | 22:00 | 367 | 253 |
| 10 | 103 | 206 | 1,74 | 15,76 | 15:40 | 261 | 160 |
| 11 | 63 | 180 | 1,18 | 12,91 | 19:00 | 317 | 235 |
| 12 | 70 | 187 | 1,21 | 13,29 | 28:30 | 475 | 334 |
| 13 | 59 | 170 | 1,34 | 14,87 | 15:15 | 256 | 150 |
| Mittelwert ± StAbw. | 67,0 ± 13,4 | 186,4 ± 11,3 | 1,3 ± 0,3 | 12,5 ± 1,8 | 19:24 ± 4:06 | 324 ± 68 | 227 ± 59 |
| | Kontrollversuch | | | | | | |
| 1 | 83 | 80 | 1,49 | 1,52 | 20:00 | / | / |
| 2 | 60 | 61 | 0,78 | 0,71 | 20:00 | / | / |
| 3 | 84 | 85 | 2,28 | 1,87 | 20:00 | / | / |
| 4 | 57 | 67 | | | 20:00 | / | / |
| 5 | 67 | 61 | 0,90 | 0,89 | 20:00 | / | / |
| 6 | 51 | 55 | 1,08 | 1,13 | 20:00 | / | / |
| 7 | 55 | 55 | 0,94 | 0,80 | 20:00 | / | / |
| 8 | 53 | 53 | 1,43 | 1,27 | 20:00 | / | / |
| 9 | 66 | 66 | 0,62 | 0,98 | 20:00 | / | / |
| 10 | 88 | 85 | 0,95 | 1,06 | 20:00 | / | / |
| 11 | 68 | 62 | 1,03 | 1,01 | 20:00 | / | / |
| 12 | 55 | 61 | 0,68 | 0,65 | 20:00 | / | / |
| 13 | 68 | 68 | 0,50 | 1,12 | 20:00 | / | / |
| Mittelwert ± StAbw. | 65,8 ± 12,4 | 66,1 ± 10,9 | 1,1 ± 0,5 | 1,1 ± 0,3 | 20:00 ± 0:00 | / | / |

| | Teilstudie I: Katecholamine | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|-------------|--------------|-------------|----------------------|--------------|---------------|-------------|
| | Adrenalin [pg/ml] | | | | Noradrenalin [pg/ml] | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | Laufband | | | | | | | |
| 1 | 30 | 87 | 123 | 50 | 51 | 127 | 1397 | 137 |
| 2 | 54 | 106 | 265 | 104 | 128 | 249 | 3252 | 116 |
| 3 | 53 | 165 | | 81 | 195 | 247 | | 208 |
| 4 | 99 | 47 | 691 | 81 | 114 | 205 | 3098 | 140 |
| 5 | 18 | 24 | 106 | 33 | 296 | 398 | 1683 | 153 |
| 6 | 23 | 33 | 238 | 35 | 85 | 153 | 2107 | 125 |
| 7 | 70 | 77 | 283 | 62 | 184 | 314 | 4433 | 199 |
| 8 | 35 | 59 | 238 | 57 | 63 | 198 | 4913 | 107 |
| 9 | 22 | 68 | 197 | 30 | 91 | 186 | 3865 | 211 |
| 10 | 71 | 127 | 561 | 96 | 301 | 464 | 2561 | 329 |
| 11 | 44 | 60 | 467 | 192 | 120 | 188 | 3373 | 165 |
| 12 | 23 | 10 | 261 | 45 | 126 | 208 | 2542 | 159 |
| 13 | 69 | 96 | 281 | 33 | 156 | 312 | 3766 | 215 |
| Mittelwert | 47 | 74 | 309 | 69 | 147 | 250 | 3083 | 174 |
| ± StAbw. | ± 25 | ± 43 | ± 175 | ± 45 | ± 79 | ± 98 | ± 1074 | ± 59 |
| | Radergometer | | | | | | | |
| 1 | 43 | 98 | 335 | 61 | 287 | 540 | 3100 | 353 |
| 2 | 18 | 35 | 521 | 28 | 109 | 281 | 4472 | 184 |
| 3 | 158 | 172 | 270 | 18 | 173 | 270 | 3242 | 162 |
| 4 | 19 | 24 | 777 | 28 | 201 | 302 | 1539 | 232 |
| 5 | 10 | 30 | 76 | 13 | 132 | 220 | 1735 | 79 |
| 6 | 65 | 67 | 403 | 25 | 89 | 188 | 2861 | 112 |
| 7 | 26 | 36 | 214 | 23 | 197 | 289 | 1555 | 142 |
| 8 | 43 | 86 | 242 | 52 | 78 | 313 | 4603 | 95 |
| 9 | 43 | 29 | 310 | 25 | 121 | 343 | 4249 | 221 |
| 10 | 56 | 116 | 967 | 79 | 265 | 548 | 5712 | 286 |
| 11 | 43 | 86 | 264 | 54 | 78 | 263 | 3106 | 75 |
| 12 | 37 | 44 | 200 | 29 | 162 | 199 | 2052 | 160 |
| 13 | 44 | 64 | 119 | 43 | 201 | 295 | 1384 | 221 |
| Mittelwert | 47 | 68 | 361 | 37 | 161 | 311 | 3047 | 179 |
| ± StAbw. | ± 37 | ± 43 | ± 257 | ± 19 | ± 68 | ± 112 | ± 1386 | ± 83 |
| | Kontrolle | | | | | | | |
| 1 | 18 | 39 | 45 | 20 | 105 | 293 | 300 | 146 |
| 2 | 49 | 63 | 58 | 35 | 205 | 249 | 315 | 165 |
| 3 | 41 | 38 | 63 | 23 | 221 | 333 | 278 | 177 |
| 4 | 66 | 86 | 80 | 84 | 143 | 199 | 257 | 246 |
| 5 | 18 | 75 | 86 | 22 | 172 | 306 | 272 | 240 |
| 6 | 21 | 17 | 32 | 19 | 103 | 216 | 171 | 182 |
| 7 | 60 | 89 | 83 | 31 | 249 | 410 | 420 | 301 |
| 8 | 47 | 35 | 28 | 21 | 316 | 490 | 198 | 118 |
| 9 | 30 | 10 | 26 | 17 | 145 | 277 | 292 | 139 |
| 10 | 28 | 12 | 22 | 29 | 42 | 96 | 144 | 88 |
| 11 | 30 | 10 | 11 | 16 | 107 | 186 | 255 | 238 |
| 12 | 10 | 16 | 33 | 27 | 140 | 274 | 337 | 146 |
| 13 | 48 | 69 | 82 | 53 | 189 | 368 | 330 | 240 |
| Mittelwert | 36 | 43 | 49 | 31 | 164 | 284 | 274 | 186 |
| ± StAbw. | ± 17 | ± 30 | ± 27 | ± 19 | ± 72 | ± 102 | ± 74 | ± 62 |

| Proband | Teilstudie I: Thrombozytenzahl [Gpt/l] | | | |
|--------------------------------|--|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| Laufband | | | | |
| 1 | 129 | 140 | 207 | 136 |
| 2 | 243 | 256 | 288 | 238 |
| 3 | 205 | 208 | 233 | 216 |
| 4 | 160 | 173 | 228 | 167 |
| 5 | 169 | 179 | 201 | 158 |
| 6 | 239 | 244 | 284 | 270 |
| 7 | 223 | 227 | 296 | 239 |
| 8 | 152 | 149 | 204 | 157 |
| 9 | 155 | 180 | 211 | 178 |
| 10 | 244 | 227 | 307 | 243 |
| 11 | 135 | 121 | 155 | 115 |
| 12 | 206 | 229 | 255 | 224 |
| 13 | 224 | 236 | 294 | 204 |
| Mittelwert ± StAbw. | 191 ± 42 | 198 ± 44 | 243 ± 47 | 196 ± 47 |
| Radergometer | | | | |
| 1 | 115 | 120 | 192 | 133 |
| 2 | 209 | 224 | 297 | 243 |
| 3 | 216 | 245 | 277 | 245 |
| 4 | 169 | 176 | 212 | 161 |
| 5 | 152 | 168 | 173 | 152 |
| 6 | 259 | 311 | 343 | 285 |
| 7 | 223 | 223 | 271 | 233 |
| 8 | 195 | 206 | 236 | 182 |
| 9 | 177 | 200 | 233 | 197 |
| 10 | 202 | 212 | 261 | 216 |
| 11 | 122 | 135 | 163 | 132 |
| 12 | 208 | 225 | 250 | 218 |
| 13 | 230 | 222 | 279 | 215 |
| Mittelwert ± StAbw. | 190 ± 42 | 205 ± 49 | 245 ± 51 | 201 ± 47 |
| Kontrolle | | | | |
| 1 | 109 | 123 | 137 | 123 |
| 2 | 213 | 207 | 242 | 210 |
| 3 | 245 | 254 | 250 | 252 |
| 4 | 149 | 160 | 153 | 154 |
| 5 | 163 | 169 | 152 | 164 |
| 6 | 226 | 255 | 233 | 225 |
| 7 | 238 | 259 | 238 | 234 |
| 8 | 197 | 217 | 228 | 178 |
| 9 | 173 | 178 | 172 | 176 |
| 10 | 254 | 273 | 245 | 241 |
| 11 | 136 | 148 | 141 | 137 |
| 12 | 232 | 241 | 251 | 221 |
| 13 | 230 | 259 | 246 | 236 |
| Mittelwert ± StAbw. | 197 ± 47 | 211 ± 50 | 207 ± 47 | 196 ± 43 |

| Proband | Teilstudie I: mittleres Thrombozytenvolumen MPV [fl] | | | |
|--------------------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| Laufband | | | | |
| 1 | 7,2 | 7,9 | 7,4 | 7,5 |
| 2 | 7,1 | 7,3 | 7,2 | 7,3 |
| 3 | 5,5 | 5,8 | 6,2 | 6,2 |
| 4 | 6,4 | 6,6 | 6,8 | 6,2 |
| 5 | 6,6 | 6,6 | 7,5 | 6,7 |
| 6 | 7,1 | 7,0 | 7,5 | 7,3 |
| 7 | 5,5 | 5,4 | 5,5 | 5,1 |
| 8 | 5,6 | 5,8 | 6,0 | 5,8 |
| 9 | 5,7 | 5,7 | 6,1 | 5,4 |
| 10 | 6,5 | 6,6 | 6,9 | 6,3 |
| 11 | 8,2 | 7,1 | 7,8 | 7,9 |
| 12 | 5,4 | 5,5 | 6,3 | 5,2 |
| 13 | 6,0 | 5,9 | 6,2 | 5,8 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,37 ± 0,86 | 6,40 ± 0,78 | 6,72 ± 0,72 | 6,36 ± 0,92 |
| Radergometer | | | | |
| 1 | 7,0 | 7,2 | 7,8 | 7,4 |
| 2 | 6,7 | 7,1 | 7,6 | 7,1 |
| 3 | 5,7 | 6,0 | 6,0 | 5,8 |
| 4 | 6,7 | 6,4 | 6,8 | 7,1 |
| 5 | 6,8 | 7,9 | 7,7 | 7,4 |
| 6 | 7,0 | 7,4 | 7,4 | 7,1 |
| 7 | 5,4 | 5,2 | 5,8 | 6,0 |
| 8 | 5,7 | 5,5 | 5,3 | 5,3 |
| 9 | 5,5 | 5,8 | 6,2 | 5,7 |
| 10 | 6,2 | 6,3 | 6,6 | 6,2 |
| 11 | 7,5 | 7,6 | 8,2 | 7,9 |
| 12 | 5,5 | 5,7 | 5,5 | 5,4 |
| 13 | 6,2 | 5,9 | 6,7 | 6,3 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,30 ± 0,70 | 6,47 ± 0,88 | 6,74 ± 0,74 | 6,52 ± 0,86 |
| Kontrolle | | | | |
| 1 | 7,8 | 7,5 | 7,2 | 7,6 |
| 2 | 6,4 | 6,9 | 6,8 | 7,1 |
| 3 | 5,6 | 6,1 | 5,7 | 5,8 |
| 4 | 6,5 | 6,0 | 6,3 | 6,2 |
| 5 | 7,0 | 7,4 | 7,9 | 7,4 |
| 6 | 7,3 | 7,0 | 6,8 | 6,7 |
| 7 | 5,6 | 6,0 | 5,5 | 5,8 |
| 8 | 5,7 | 5,6 | 5,3 | 5,5 |
| 9 | 5,3 | 5,7 | 5,5 | 6,0 |
| 10 | 6,3 | 6,0 | 6,8 | 6,5 |
| 11 | 7,3 | 8,3 | 8,0 | 7,8 |
| 12 | 5,7 | 6,0 | 5,7 | 5,4 |
| 13 | 6,8 | 6,2 | 6,3 | 6,2 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,41 ± 0,80 | 6,52 ± 0,82 | 6,45 ± 0,90 | 6,46 ± 0,80 |

| Proband | Teilstudie I: Vorwärtsstreulicht Laufband-Stufentest [dimensionslos] | | | |
|-----------------------------|--|---------------|----------------|---------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| unfixiert | | | | |
| 1 | 10,10 | 10,60 | 11,50 | 10,70 |
| 2 | 8,74 | 8,91 | 9,03 | 8,66 |
| 3 | 7,79 | 8,29 | 8,53 | 7,90 |
| 4 | 8,94 | 9,13 | 9,35 | 9,02 |
| 5 | 9,99 | 10,00 | 10,10 | 9,81 |
| 6 | 9,79 | 10,00 | 10,20 | 9,85 |
| 7 | 7,42 | 7,37 | 7,18 | 7,23 |
| 8 | 7,42 | 8,13 | 7,92 | 7,40 |
| 9 | 7,78 | 7,87 | 7,81 | 7,49 |
| 10 | 8,27 | 8,85 | 8,71 | 8,32 |
| 11 | 12,40 | 12,70 | 12,50 | 11,90 |
| 12 | 7,30 | 7,50 | 7,66 | 7,29 |
| 13 | 8,71 | 8,69 | 8,83 | 8,47 |
| Mittelwert | 8,82 | 9,08 | 9,18 | 8,77 |
| ± StAbw. | ± 1,4 | ± 1,47 | ± 1,55 | ± 1,44 |
| nachträglich fixiert | | | | |
| 1 | 7,82 | 8,26 | 7,99 | 7,96 |
| 2 | 7,04 | 7,45 | 7,45 | 7,02 |
| 3 | 5,92 | 6,07 | 6,88 | 5,90 |
| 4 | 6,66 | 6,62 | 6,78 | 6,30 |
| 5 | 7,21 | 7,02 | 7,34 | 7,00 |
| 6 | 7,26 | 7,58 | 8,42 | 7,52 |
| 7 | 5,50 | 5,27 | 5,32 | 5,12 |
| 8 | 5,12 | 5,13 | 5,20 | 5,33 |
| 9 | 5,99 | 5,99 | 6,04 | 5,47 |
| 10 | 6,54 | 6,81 | 7,27 | 6,53 |
| 11 | 8,76 | 8,65 | 9,33 | 8,68 |
| 12 | 5,45 | 5,40 | 6,02 | 5,29 |
| 13 | 6,30 | 6,22 | 6,70 | 6,35 |
| Mittelwert | 6,58 | 6,65 | 6,98 | 6,50 |
| ± StAbw. | ± 1,03 | ± 1,03 | ± 1,19 | ± 1,11 |
| direkt fixiert | | | | |
| 1 | 6,19 | 6,59 | 6,18 | 6,00 |
| 2 | 5,97 | 6,08 | 5,91 | 5,89 |
| 3 | 4,14 | 4,22 | 4,96 | 4,30 |
| 4 | 5,30 | 5,19 | 5,29 | 4,91 |
| 5 | 5,29 | 5,18 | 5,31 | 5,13 |
| 6 | 5,96 | 5,97 | 6,32 | 5,95 |
| 7 | 4,38 | 4,02 | 4,18 | 4,12 |
| 8 | 3,80 | 3,76 | 3,84 | 3,93 |
| 9 | 4,84 | 5,18 | 4,75 | 4,30 |
| 10 | 5,43 | 5,87 | 5,68 | 5,39 |
| 11 | 6,38 | 6,27 | 6,76 | 6,41 |
| 12 | 3,27 | 4,32 | 4,91 | 4,08 |
| 13 | 4,60 | 4,47 | 4,69 | 4,31 |
| Mittelwert | 5,04 | 5,16 | 5,29 | 4,98 |
| ± StAbw. | ± 0,97 | ± 0,94 | ± 0,86 | ± 0,87 |

| Proband | Teilstudie I: Seitwärtsstreulicht Laufband-Stufentest [dimensionslos] | | | |
|-----------------------------|---|---------------|----------------|---------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| unfixiert | | | | |
| 1 | 2,65 | 2,55 | 2,59 | 2,50 |
| 2 | 2,25 | 2,22 | 2,28 | 2,20 |
| 3 | 2,25 | 2,15 | 2,11 | 2,19 |
| 4 | 2,40 | 2,35 | 2,41 | 2,33 |
| 5 | 2,40 | 2,39 | 2,38 | 2,33 |
| 6 | 2,42 | 2,43 | 2,41 | 2,41 |
| 7 | 2,06 | 2,00 | 2,03 | 2,06 |
| 8 | 1,92 | 2,18 | 1,96 | 1,86 |
| 9 | 2,15 | 2,14 | 2,09 | 2,10 |
| 10 | 2,26 | 2,23 | 2,27 | 2,31 |
| 11 | 2,72 | 2,72 | 2,61 | 2,64 |
| 12 | 1,93 | 1,91 | 1,88 | 2,09 |
| 13 | 2,36 | 2,33 | 2,33 | 2,26 |
| Mittelwert | 2,29 | 2,28 | 2,26 | 2,25 |
| ± StAbw. | ± 0,24 | ± 0,22 | ± 0,23 | ± 0,20 |
| nachträglich fixiert | | | | |
| 1 | 2,81 | 2,67 | 2,76 | 2,65 |
| 2 | 2,31 | 2,22 | 2,27 | 2,22 |
| 3 | 2,41 | 2,32 | 2,21 | 2,32 |
| 4 | 2,53 | 2,54 | 2,52 | 2,45 |
| 5 | 2,61 | 2,55 | 2,56 | 2,54 |
| 6 | 2,61 | 2,57 | 2,47 | 2,51 |
| 7 | 2,71 | 2,13 | 2,17 | 2,08 |
| 8 | 2,03 | 2,06 | 2,11 | 2,06 |
| 9 | 2,17 | 2,15 | 2,16 | 2,15 |
| 10 | 2,36 | 2,32 | 2,32 | 2,32 |
| 11 | 2,95 | 2,98 | 2,95 | 2,94 |
| 12 | 2,11 | 2,12 | 2,02 | 2,10 |
| 13 | 2,52 | 2,45 | 2,48 | 2,44 |
| Mittelwert | 2,47 | 2,39 | 2,38 | 2,37 |
| ± StAbw. | ± 0,27 | ± 0,24 | ± 0,27 | ± 0,26 |
| direkt fixiert | | | | |
| 1 | 3,13 | 3,03 | 3,16 | 3,08 |
| 2 | 2,45 | 2,33 | 2,38 | 2,32 |
| 3 | 2,60 | 2,62 | 2,62 | 2,55 |
| 4 | 2,91 | 2,95 | 2,98 | 2,90 |
| 5 | 3,02 | 2,94 | 2,96 | 2,96 |
| 6 | 2,92 | 2,76 | 2,81 | 2,86 |
| 7 | 2,46 | 2,52 | 2,58 | 2,50 |
| 8 | 2,44 | 2,47 | 2,38 | 2,42 |
| 9 | 2,39 | 2,33 | 2,37 | 2,38 |
| 10 | 2,61 | 2,60 | 2,58 | 2,56 |
| 11 | 3,20 | 3,15 | 3,19 | 3,13 |
| 12 | 1,54 | 2,32 | 2,30 | 2,22 |
| 13 | 2,82 | 2,82 | 2,85 | 2,80 |
| Mittelwert | 2,65 | 2,68 | 2,70 | 2,67 |
| ± StAbw. | ± 0,43 | ± 0,28 | ± 0,31 | ± 0,30 |

| Proband | Teilstudie I: mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE unstimuliert Laufband-Stufentest [dimensionslos] | | | |
|--------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| unfixiert | | | | |
| 1 | 15,1 | 14,8 | 19,2 | 15,3 |
| 2 | 15,3 | 14,4 | 16,6 | 13,8 |
| 3 | 17,3 | 15,2 | 13,8 | 16,7 |
| 4 | 15,3 | 15,9 | 15,6 | 14,7 |
| 5 | 14,8 | 14,7 | 14,4 | 13,0 |
| 6 | 14,7 | 15,8 | 17,2 | 15,3 |
| 7 | 12,2 | 11,5 | 12,2 | 12,5 |
| 8 | 16,0 | 14,0 | 15,8 | 14,4 |
| 9 | 17,3 | 15,1 | 15,7 | 16,5 |
| 10 | 15,3 | 13,2 | 15,4 | 13,5 |
| 11 | 20,6 | 21,7 | 19,4 | 18,0 |
| 12 | 13,2 | 12,4 | 12,4 | 13,7 |
| 13 | 16,3 | 16,4 | 15,6 | 16,3 |
| Mittelwert ± StAbw. | 15,6 ± 2,1 | 15,0 ± 2,5 | 15,6 ± 2,2 | 14,9 ± 1,6 |
| nachträglich fixiert | | | | |
| 1 | 16,1 | 15,7 | 16,7 | 15,3 |
| 2 | 15,3 | 15,5 | 16,5 | 15,5 |
| 3 | 18,1 | 15,3 | 14,5 | 16,9 |
| 4 | 15,5 | 16,7 | 16,3 | 15,8 |
| 5 | 15,0 | 15,2 | 15,6 | 13,5 |
| 6 | 16,7 | 15,9 | 16,8 | 16,2 |
| 7 | 12,6 | 12,4 | 12,6 | 12,9 |
| 8 | 17,7 | 18,1 | 16,3 | 14,8 |
| 9 | 18,0 | 17,5 | 17,1 | 17,3 |
| 10 | 16,5 | 14,7 | 15,5 | 14,0 |
| 11 | 21,3 | 20,8 | 19,4 | 18,8 |
| 12 | 14,7 | 11,9 | 13,1 | 13,6 |
| 13 | 16,9 | 16,1 | 16,6 | 12,2 |
| Mittelwert ± StAbw. | 16,5 ± 2,1 | 15,8 ± 2,3 | 15,9 ± 1,8 | 15,1 ± 1,9 |
| direkt fixiert | | | | |
| 1 | 30,0 | 29,0 | 31,4 | 29,0 |
| 2 | 24,4 | 25,0 | 28,6 | 24,0 |
| 3 | 25,8 | 19,9 | 24,7 | 22,7 |
| 4 | 27,1 | 26,3 | 28,2 | 23,9 |
| 5 | 23,1 | 24,7 | 25,9 | 21,1 |
| 6 | 25,3 | 24,6 | 26,8 | 23,9 |
| 7 | 22,2 | 20,3 | 20,0 | 18,1 |
| 8 | 31,3 | 28,5 | 29,9 | 26,4 |
| 9 | 25,5 | 26,9 | 27,2 | 25,1 |
| 10 | 24,6 | 26,3 | 28,1 | 24,8 |
| 11 | 35,5 | 36,2 | 36,5 | 32,0 |
| 12 | 21,0 | 24,1 | 24,7 | 19,6 |
| 13 | 29,7 | 29,0 | 28,8 | 23,7 |
| Mittelwert ± StAbw. | 26,6 ± 4,1 | 26,2 ± 4,1 | 27,8 ± 3,9 | 24,9 ± 3,7 |

| Proband | Teilstudie I: mittlere Fluoreszenzintensität CD42b-PE unstimuliert Laufband-Stufentest [dimensionslos] | | | |
|--------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| unfixiert | | | | |
| 1 | 28,4 | 32,6 | 35,4 | 32,9 |
| 2 | 26,3 | 22,6 | 27,0 | 24,9 |
| 3 | 30,4 | 31,1 | 30,5 | |
| 4 | 28,9 | 29,6 | 30,5 | 27,6 |
| 5 | 28,4 | 36,5 | 37,7 | 31,8 |
| 6 | 31,4 | 31,3 | 30,0 | 31,4 |
| 7 | 25,9 | 23,7 | 23,5 | 25,4 |
| 8 | 27,2 | 24,0 | 27,5 | 26,3 |
| 9 | 28,5 | 27,7 | 28,3 | 27,8 |
| 10 | 29,3 | 26,9 | 27,8 | 25,5 |
| 11 | 27,0 | 26,3 | 25,2 | 24,3 |
| 12 | 26,5 | 25,4 | 26,6 | 27,6 |
| 13 | 28,4 | 25,4 | 25,9 | 28,8 |
| Mittelwert ± StAbw. | 28,2 ± 1,6 | 27,9 ± 4,1 | 28,9 ± 4,0 | 27,9 ± 2,9 |
| nachträglich fixiert | | | | |
| 1 | 32,8 | 31,7 | 37,1 | 33,9 |
| 2 | 26,7 | 27,9 | 29,0 | 24,9 |
| 3 | 30,9 | 32,1 | 31,1 | 35,4 |
| 4 | 29,7 | 30,2 | 31,5 | 30,2 |
| 5 | 36,1 | 37,2 | 37,4 | 34,3 |
| 6 | 31,6 | 32,9 | 28,9 | 32,0 |
| 7 | 25,9 | 26,3 | 27,6 | 27,7 |
| 8 | 26,0 | 25,7 | 28,1 | 25,3 |
| 9 | 27,9 | 28,1 | 30,5 | 28,5 |
| 10 | 30,7 | 27,8 | 28,5 | 26,5 |
| 11 | 28,6 | 26,2 | 25,7 | 25,6 |
| 12 | 27,2 | 26,3 | 26,7 | 26,8 |
| 13 | 31,5 | 33,4 | 29,4 | 31,1 |
| Mittelwert ± StAbw. | 29,7 ± 3,0 | 29,7 ± 3,5 | 30,1 ± 3,6 | 29,4 ± 3,7 |
| direkt fixiert | | | | |
| 1 | 27,1 | 26,4 | 30,3 | 26,5 |
| 2 | 19,9 | 20,3 | 21,8 | 19,8 |
| 3 | 20,0 | 21,0 | 21,6 | 23,4 |
| 4 | 22,1 | 23,7 | 24,4 | 24,5 |
| 5 | 25,2 | 26,7 | 27,7 | 23,6 |
| 6 | 23,1 | 21,6 | 22,2 | 21,9 |
| 7 | 19,3 | 19,9 | 17,2 | 21,5 |
| 8 | 21,4 | 20,0 | 22,6 | 20,0 |
| 9 | 22,7 | 22,4 | 23,1 | 20,8 |
| 10 | 23,3 | 22,0 | 24,3 | 21,2 |
| 11 | 23,1 | 21,5 | 21,4 | 19,1 |
| 12 | 21,9 | 20,1 | 20,7 | 21,9 |
| 13 | 25,4 | 22,0 | 23,3 | 21,1 |
| Mittelwert ± StAbw. | 22,7 ± 2,3 | 22,1 ± 2,2 | 23,1 ± 3,2 | 21,9 ± 2,1 |

| | Teilstudie I: CD62P unstimuliert Laufband-Stufentest | | | | | | | |
|-------------------|--|--------------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | % CD62P positive Zellen [%] | | | | MFI CD62P - FITC [dimensionslos] | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | unfixiert | | | | | | | |
| 1 | 0,5 | 0,5 | 1,6 | 1,1 | 0,88 | 0,85 | 1,02 | 1,08 |
| 2 | 1,0 | 0,8 | 2,2 | 1,3 | 0,93 | 0,88 | 1,22 | 1,10 |
| 3 | 0,7 | 0,6 | 2,1 | 1,9 | 0,96 | 0,91 | 1,00 | 1,13 |
| 4 | 0,7 | 0,6 | 0,8 | 1,0 | 0,99 | 0,97 | 1,08 | 1,07 |
| 5 | 0,8 | 1,0 | 2,0 | 1,0 | 0,88 | 0,89 | 1,10 | 0,93 |
| 6 | 1,4 | 1,2 | 1,6 | 0,7 | 1,21 | 1,13 | 1,14 | 1,09 |
| 7 | 0,9 | 1,0 | 2,1 | 1,0 | 0,77 | 0,76 | 0,96 | 0,79 |
| 8 | 0,8 | 1,8 | 1,0 | 1,3 | 0,91 | 1,08 | 0,93 | 0,98 |
| 9 | 0,7 | 1,0 | 0,8 | 0,4 | 0,96 | 1,09 | 1,03 | 0,85 |
| 10 | 0,5 | 1,2 | 0,8 | 0,9 | 0,83 | 0,96 | 0,86 | 0,84 |
| 11 | 0,9 | 0,5 | 0,9 | 0,8 | 0,95 | 0,94 | 0,91 | 0,92 |
| 12 | 1,0 | 1,0 | 2,4 | 0,9 | 0,86 | 0,82 | 1,01 | 0,81 |
| 13 | 2,0 | 1,2 | 1,9 | 1,1 | 1,11 | 0,98 | 1,09 | 0,94 |
| Mittelwert | 0,9 | 0,9 | 1,6 | 1,0 | 0,94 | 0,94 | 1,03 | 0,96 |
| ± StAbw. | ± 0,4 | ± 0,4 | ± 0,6 | ± 0,3 | ± 0,12 | ± 0,11 | ± 0,10 | ± 0,12 |
| | nachträglich fixiert | | | | | | | |
| 1 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 0,4 | 0,92 | 0,90 | 0,99 | 0,87 |
| 2 | 1,3 | 0,7 | 1,2 | 0,8 | 1,01 | 0,89 | 1,01 | 0,93 |
| 3 | 0,8 | 0,4 | 1,5 | 0,8 | 0,96 | 0,84 | 0,96 | 0,91 |
| 4 | 0,8 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | 0,98 | 1,02 | 1,05 | 0,94 |
| 5 | 0,7 | 0,8 | 1,7 | 2,0 | 0,91 | 0,84 | 0,98 | 1,10 |
| 6 | 0,6 | 1,2 | 1,2 | 0,5 | 0,98 | 1,10 | 1,04 | 1,03 |
| 7 | 1,1 | 0,9 | 1,3 | 1,4 | 0,77 | 0,76 | 0,80 | 0,88 |
| 8 | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 1,2 | 0,89 | 0,89 | 0,94 | 1,00 |
| 9 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,9 | 0,89 | 0,97 | 0,95 | 1,02 |
| 10 | 0,7 | 0,9 | 0,8 | 0,5 | 0,81 | 0,85 | 0,81 | 0,79 |
| 11 | 0,7 | 0,5 | 0,9 | 0,6 | 0,90 | 0,89 | 0,91 | 0,97 |
| 12 | 1,0 | 0,9 | 1,5 | 1,1 | 0,81 | 0,81 | 0,92 | 0,85 |
| 13 | 0,7 | 1,0 | 1,2 | 1,3 | 0,92 | 0,89 | 1,01 | 1,02 |
| Mittelwert | 0,8 | 0,8 | 1,1 | 0,9 | 0,90 | 0,89 | 0,95 | 0,95 |
| ± StAbw. | ± 0,2 | ± 0,2 | ± 0,3 | ± 0,5 | ± 0,07 | ± 0,09 | ± 0,08 | ± 0,09 |
| | direkt fixiert | | | | | | | |
| 1 | 1,3 | 0,8 | 1,1 | 1,4 | 1,21 | 1,07 | 1,24 | 1,35 |
| 2 | 1,5 | 0,9 | 1,1 | 1,4 | 1,21 | 1,09 | 1,17 | 1,28 |
| 3 | 0,6 | 0,8 | 0,9 | 0,7 | 0,99 | 1,04 | 1,04 | 1,05 |
| 4 | 1,0 | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 1,24 | 1,26 | 1,21 | 1,12 |
| 5 | 1,2 | 2,0 | 1,5 | 1,3 | 1,10 | 1,21 | 1,14 | 1,11 |
| 6 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | 1,13 | 1,10 | 1,14 | 1,17 |
| 7 | 1,3 | 1,4 | 1,4 | 2,1 | 0,92 | 0,96 | 0,93 | 1,04 |
| 8 | 1,5 | 1,3 | 1,2 | 1,8 | 1,10 | 1,12 | 1,11 | 1,21 |
| 9 | 1,0 | 1,3 | 1,2 | 0,8 | 1,22 | 1,25 | 1,24 | 1,04 |
| 10 | 1,2 | 1,1 | 0,8 | 0,7 | 1,05 | 1,06 | 0,97 | 0,93 |
| 11 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,26 | 1,23 | 1,28 | 1,28 |
| 12 | 0,6 | 1,1 | 1,3 | 1,8 | 0,76 | 0,93 | 1,02 | 0,99 |
| 13 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 1,10 | 1,10 | 1,06 | 1,08 |
| Mittelwert | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 1,2 | 1,10 | 1,11 | 1,12 | 1,13 |
| ± StAbw. | ± 0,3 | ± 0,4 | ± 0,2 | ± 0,5 | ± 0,14 | ± 0,10 | ± 0,11 | ± 0,12 |

| | Teilstudie I: PAC-1 unstimuliert Laufband-Stufentest | | | | | | | |
|-------------------|--|---------------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | % PAC-1 positive Zellen [%] | | | | MFI PAC-1 - FITC [dimensionslos] | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | unfixiert | | | | | | | |
| 1 | 1,3 | 1,6 | 2,0 | 1,2 | 0,52 | 0,55 | 0,55 | 0,54 |
| 2 | 1,4 | 1,4 | 2,5 | 1,3 | 0,53 | 0,51 | 0,58 | 0,49 |
| 3 | 0,7 | 0,6 | 1,3 | | 0,51 | 0,48 | 0,50 | |
| 4 | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 1,6 | 0,56 | 0,54 | 0,53 | 0,50 |
| 5 | 0,6 | 1,4 | 1,9 | 1,2 | 0,39 | 0,55 | 0,56 | 0,48 |
| 6 | 1,7 | 1,9 | 3,6 | 1,3 | 0,59 | 0,63 | 0,68 | 0,58 |
| 7 | 1,4 | 1,6 | 1,9 | 1,9 | 0,39 | 0,42 | 0,37 | 0,41 |
| 8 | 3,0 | 3,1 | 2,8 | 3,1 | 0,64 | 0,61 | 0,61 | 0,60 |
| 9 | 1,2 | 1,1 | 1,2 | 0,9 | 0,53 | 0,53 | 0,48 | 0,51 |
| 10 | 1,7 | 1,4 | 2,6 | 1,6 | 0,55 | 0,48 | 0,54 | 0,48 |
| 11 | 5,4 | 4,5 | 4,6 | 3,3 | 0,87 | 0,85 | 0,73 | 0,70 |
| 12 | 1,5 | 1,3 | 1,3 | 2,5 | 0,52 | 0,49 | 0,46 | 0,62 |
| 13 | 1,6 | 1,3 | 1,9 | 1,5 | 0,57 | 0,53 | 0,49 | 0,51 |
| Mittelwert | 1,8 | 1,8 | 2,2 | 1,8 | 0,55 | 0,55 | 0,54 | 0,53 |
| ± StAbw. | ± 1,2 | ± 1,0 | ± 1,0 | ± 0,8 | ± 0,12 | ± 0,10 | ± 0,09 | ± 0,08 |
| | nachträglich fixiert | | | | | | | |
| 1 | 2,5 | 2,8 | 2,7 | 2,4 | 0,69 | 0,65 | 0,68 | 0,67 |
| 2 | 4,1 | 2,6 | 4,5 | 2,4 | 0,78 | 0,67 | 0,79 | 0,66 |
| 3 | 0,9 | 1,2 | 5,5 | 1,5 | 0,63 | 0,62 | 0,89 | 0,70 |
| 4 | 3,6 | 3,8 | 3,6 | 3,0 | 0,72 | 0,76 | 0,73 | 0,69 |
| 5 | 2,1 | 2,5 | 3,0 | 1,7 | 0,63 | 0,66 | 0,68 | 0,59 |
| 6 | 2,7 | 3,4 | 11,7 | 2,5 | 0,73 | 0,80 | 1,30 | 0,75 |
| 7 | 2,6 | 2,6 | 3,3 | 3,3 | 0,54 | 0,51 | 0,57 | 0,53 |
| 8 | 3,5 | 3,8 | 5,6 | 3,9 | 0,76 | 0,82 | 0,92 | 0,78 |
| 9 | 2,1 | 2,4 | 3,2 | 2,4 | 0,67 | 0,67 | 0,73 | 0,70 |
| 10 | 3,0 | 3,1 | 3,1 | 2,4 | 0,55 | 0,67 | 0,65 | 0,57 |
| 11 | 10,3 | 10,0 | 10,0 | 8,9 | 1,25 | 1,26 | 1,17 | 1,17 |
| 12 | 2,1 | 1,6 | 2,6 | 1,9 | 0,62 | 0,57 | 0,61 | 0,58 |
| 13 | 2,2 | 2,9 | 6,9 | 4,5 | 0,68 | 0,68 | 0,91 | 0,82 |
| Mittelwert | 3,2 | 3,3 | 5,1 | | 0,71 | 0,72 | 0,82 | 0,71 |
| ± StAbw. | ± 2,3 | ± 2,2 | ± 2,9 | ± | ± 0,18 | ± 0,18 | ± 0,22 | ± 0,16 |
| | direkt fixiert | | | | | | | |
| 1 | 80,6 | 79,0 | 77,4 | 76,2 | 6,74 | 6,66 | 6,33 | 6,13 |
| 2 | 79,8 | 77,8 | 77,0 | 81,4 | 6,48 | 6,12 | 6,26 | 6,67 |
| 3 | 58,2 | 38,4 | 60,7 | 62,3 | 4,40 | 3,14 | 4,58 | 4,68 |
| 4 | 51,2 | 79,3 | 79,3 | 79,8 | 6,42 | 6,13 | 6,10 | 6,08 |
| 5 | 66,7 | 70,0 | 73,8 | 65,3 | 4,54 | 4,97 | 5,32 | 4,37 |
| 6 | 75,5 | 69,7 | 77,9 | 72,8 | 6,04 | 5,39 | 6,80 | 5,73 |
| 7 | 82,4 | 79,9 | 56,7 | 56,2 | 5,49 | 5,23 | 3,00 | 3,01 |
| 8 | 81,8 | 67,5 | 79,6 | 76,2 | 6,66 | 4,94 | 6,23 | 5,95 |
| 9 | 79,4 | 66,5 | 74,0 | 78,2 | 5,89 | 4,65 | 5,38 | 5,71 |
| 10 | 82,7 | 79,1 | 71,9 | 79,1 | 6,45 | 6,01 | 5,18 | 5,86 |
| 11 | 89,3 | 82,8 | 81,8 | 88,1 | 9,47 | 7,50 | 7,32 | 8,39 |
| 12 | 77,1 | 78,3 | 72,0 | 75,9 | 5,48 | 5,63 | 5,04 | 5,48 |
| 13 | 83,4 | 79,3 | 69,9 | 61,9 | 6,61 | 6,03 | 5,01 | 4,06 |
| Mittelwert | 76,0 | 72,9 | 73,2 | 73,3 | 6,21 | 5,57 | 5,58 | 5,55 |
| ± StAbw. | ± 10,9 | ± 11,7 | ± 7,4 | ± 9,2 | ± 1,25 | ± 1,06 | ± 1,11 | ± 1,33 |

| Proband | Teilstudie I: Negativkontrollen Laufband-Stufentest | | | |
|-------------------|--|---------------|---------------|---------------|
| | A | B | C | D |
| | MFI CD62P - FITC Negativkontrolle [dimensionslos] | | | |
| 1 | 0,88 | 0,91 | 0,89 | 0,79 |
| 2 | 0,93 | 0,83 | 0,91 | 0,88 |
| 3 | 0,84 | 0,95 | 0,99 | 0,91 |
| 4 | 0,99 | 0,94 | 0,99 | 1,07 |
| 5 | 0,86 | 1,01 | 0,96 | 1,01 |
| 6 | 1,07 | 1,00 | 0,96 | 0,99 |
| 7 | 0,78 | 0,72 | 0,78 | 0,87 |
| 8 | 0,85 | 0,84 | 0,87 | 0,85 |
| 9 | 0,96 | 0,88 | 0,93 | 0,87 |
| 10 | 0,80 | 0,90 | 0,83 | 0,79 |
| 11 | 0,90 | 0,91 | 0,97 | 0,88 |
| 12 | 0,76 | 0,81 | 0,78 | 0,81 |
| 13 | 0,88 | 0,96 | 0,86 | 0,91 |
| Mittelwert | 0,89 | 0,90 | 0,90 | 0,89 |
| ± StAbw. | ± 0,09 | ± 0,08 | ± 0,07 | ± 0,09 |
| | MFI PAC-1 - FITC Negativkontrolle [dimensionslos] | | | |
| 1 | 0,45 | 0,45 | 0,48 | 0,43 |
| 2 | 0,45 | 0,40 | 0,45 | 0,39 |
| 3 | 0,41 | 0,40 | 0,70 | 0,44 |
| 4 | 0,45 | 0,46 | 0,46 | 0,40 |
| 5 | 0,44 | 0,46 | 0,47 | 0,42 |
| 6 | 0,46 | 0,49 | 0,46 | 0,47 |
| 7 | 0,39 | 0,42 | 0,39 | 0,41 |
| 8 | 0,53 | 0,44 | 0,55 | 0,48 |
| 9 | 0,45 | 0,46 | 0,47 | 0,49 |
| 10 | 0,46 | 0,48 | 0,45 | 0,45 |
| 11 | 0,48 | 0,60 | 0,50 | 0,46 |
| 12 | 0,44 | 0,41 | 0,43 | 0,42 |
| 13 | 0,48 | 0,48 | 0,53 | 0,47 |
| Mittelwert | 0,45 | 0,46 | 0,49 | 0,44 |
| ± StAbw. | ± 0,03 | ± 0,05 | ± 0,08 | ± 0,03 |

| | Teilstudie I: Thrombozytenaktivität Wärmebad (Rad-Stufentest) | | | | | | | |
|-------------------|---|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| | unstimuliert | | | | 10 min Wärmebad | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | % CD62P positive Zellen [%] | | | | | | | |
| 1 | 0,7 | 0,5 | 1,0 | 0,6 | 0,9 | 0,7 | 0,9 | 0,8 |
| 2 | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,8 | 0,4 |
| 3 | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,9 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 |
| 4 | 0,9 | 1,3 | 0,9 | 1,4 | 1,3 | 1,5 | 1,6 | 1,3 |
| 5 | 0,9 | 0,9 | 2,0 | 1,4 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 1,2 |
| 6 | 1,0 | 0,7 | 0,4 | 0,3 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | 0,4 |
| 7 | 1,3 | 1,0 | 1,5 | 1,4 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,4 |
| 8 | 0,8 | 0,5 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 0,9 | 0,8 | 0,6 |
| 9 | 0,8 | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,9 | 0,7 | 1,0 | 1,0 |
| 10 | 2,5 | 1,1 | 1,7 | 2,0 | 1,9 | 1,6 | 2,3 | 1,6 |
| 11 | 0,9 | 0,7 | 1,1 | 1,1 | 0,9 | 1,4 | 1,3 | 1,5 |
| 12 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,7 | | 0,9 | 1,1 |
| 13 | 1,1 | 1,3 | 3,3 | 1,5 | 1,0 | 1,4 | 1,6 | 1,7 |
| Mittelwert | 1,1 | 0,9 | 1,2 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,2 | 1,1 |
| ± StAbw. | ± 0,5 | ± 0,3 | ± 0,8 | ± 0,5 | ± 0,3 | ± 0,4 | ± 0,5 | ± 0,4 |
| | % PAC-1 positive Zellen [%] | | | | | | | |
| 1 | 2,8 | 2,2 | 3,6 | 2,5 | 5,6 | 4,9 | 8,2 | 6,0 |
| 2 | 5,1 | 5,7 | 4,5 | 0,7 | 9,9 | 6,6 | 10,6 | 8,2 |
| 3 | 2,8 | 3,1 | 4,1 | 2,5 | 5,4 | 4,9 | 6,4 | 4,7 |
| 4 | 1,4 | 1,6 | 2,1 | 1,8 | 2,8 | 2,7 | 4,2 | 3,8 |
| 5 | 1,8 | 1,9 | 2,4 | 1,1 | 2,5 | 3,9 | 2,8 | 3,9 |
| 6 | 3,8 | 2,9 | 2,6 | 1,0 | 4,6 | 4,1 | 22,9 | 2,5 |
| 7 | 2,0 | 1,9 | 3,3 | 3,8 | 3,7 | 4,5 | 3,7 | 4,4 |
| 8 | 3,0 | 2,7 | 3,1 | 2,4 | 6,9 | 4,4 | 4,5 | 5,2 |
| 9 | 2,4 | 2,1 | 2,0 | 2,2 | 4,3 | 5,0 | 6,7 | 5,2 |
| 10 | 4,1 | 4,0 | 6,7 | 3,9 | 5,9 | 6,0 | 37,3 | 7,0 |
| 11 | 3,6 | 4,8 | 5,2 | 4,6 | 5,5 | 7,4 | 9,3 | 7,3 |
| 12 | 2,5 | 2,6 | 2,8 | 2,7 | 3,8 | 4,8 | 6,3 | 4,9 |
| 13 | 2,0 | 1,8 | 14,7 | 2,5 | 3,5 | 3,2 | 9,1 | 4,5 |
| Mittelwert | 2,9 | 2,9 | 4,4 | 2,4 | 4,9 | 4,8 | 10,2 | 5,2 |
| ± StAbw. | ± 1,0 | ± 1,3 | ± 3,4 | ± 1,2 | ± 2,0 | ± 1,3 | ± 9,6 | ± 1,6 |

| Proband | Teilstudie I: lösliches P-Selektin [mg/l] | | | |
|----------------------------|---|---------------|----------------|---------------|
| | Ruhe | vor Belastung | nach Belastung | 1 h Ruhe |
| Laufband-Stufentest | | | | |
| 1 | 55,8 | 47,8 | 52,6 | 50,3 |
| 2 | 30,8 | 29,2 | 36,0 | 33,0 |
| 3 | 42,9 | 41,9 | 43,1 | 47,8 |
| 4 | 56,1 | 38,0 | 50,8 | 37,9 |
| 5 | 20,0 | 43,9 | 56,4 | 59,4 |
| 6 | 24,9 | 30,5 | 41,9 | 22,3 |
| 7 | 39,5 | 35,7 | 44,5 | 38,7 |
| 8 | 53,1 | 57,6 | 78,0 | 62,0 |
| 9 | 24,2 | 22,6 | 24,9 | 29,9 |
| 10 | 61,1 | 46,8 | 60,3 | 77,4 |
| 11 | 45,5 | 48,4 | 54,9 | 49,9 |
| 12 | 27,7 | 27,6 | 32,8 | 31,2 |
| 13 | 24,5 | 26,3 | 25,5 | 28,6 |
| Mittelwert | 38,9 | 38,2 | 46,3 | 43,7 |
| ± StAbw. | ± 14,4 | ± 10,6 | ± 14,9 | ± 15,9 |
| Kontrolle | | | | |
| 1 | 35,7 | 49,7 | 45,9 | 40,9 |
| 2 | 36,8 | 35,5 | 44,2 | 35,5 |
| 3 | 52,3 | 37,2 | 32,4 | 34,8 |
| 4 | 21,9 | 19,5 | 22,4 | 17,2 |
| 5 | 14,6 | 43,9 | 56,1 | 40,3 |
| 6 | 20,6 | 21,5 | 23,2 | 16,9 |
| 7 | 38,8 | 36,5 | 38,4 | 37,6 |
| 8 | 74,7 | 83,7 | 84,0 | 70,5 |
| 9 | 23,9 | 24,6 | 25,9 | 24,8 |
| 10 | 53,7 | 54,3 | 45,1 | 44,3 |
| 11 | 53,1 | 45,3 | 59,7 | 65,8 |
| 12 | 29,9 | 32,3 | 29,9 | 29,9 |
| 13 | 30,2 | 25,6 | 30,5 | 27,6 |
| Mittelwert | 37,4 | 39,2 | 41,4 | 37,4 |
| ± StAbw. | ± 17,0 | ± 17,2 | ± 17,5 | ± 16,1 |

| | Teilstudie I: Thrombozytenreaktivität CD62P Laufband-Stufentest | | | | | | | |
|-------------------|--|---------------|----------------|---------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| | Laufband-Stufentest | | | | Kontrolle | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | % CD62P positive Zellen [%] nach Stimulation mit 5 µM ADP | | | | | | | |
| 1 | 4,3 | 5,1 | 6,9 | 4,9 | 5,2 | 6,4 | 6,0 | 5,0 |
| 2 | 1,7 | 1,3 | 2,0 | 1,3 | 1,7 | 1,9 | 1,8 | 2,8 |
| 3 | 2,0 | 2,2 | 4,1 | 1,7 | 4,0 | 2,3 | 2,9 | 2,7 |
| 4 | 6,4 | 5,6 | 7,3 | 5,6 | 6,1 | 6,7 | 5,6 | 5,9 |
| 5 | 11,9 | 11,4 | 14,7 | 11,6 | 8,4 | 8,8 | 9,5 | 6,3 |
| 6 | 3,9 | 4,4 | 24,2 | | 4,2 | 4,6 | 9,3 | 9,7 |
| 7 | 2,5 | 2,4 | 3,8 | 1,7 | 2,6 | 2,7 | 2,6 | 2,9 |
| 8 | 3,1 | 3,1 | 3,8 | 2,4 | 3,6 | 3,3 | 3,5 | 3,4 |
| 9 | 1,3 | 1,1 | 2,2 | 1,7 | 1,4 | 1,7 | 1,7 | 1,8 |
| 10 | 2,5 | 3,8 | 3,1 | 2,7 | 3,1 | 6,8 | 4,3 | 2,9 |
| 11 | 12,6 | 9,3 | 14,5 | 11,6 | 9,2 | 8,7 | | 6,4 |
| 12 | 3,4 | 4,2 | 4,6 | 3,6 | 4,0 | 4,0 | 4,2 | 5,0 |
| 13 | 2,0 | 1,6 | 2,6 | 1,4 | 3,2 | 2,1 | 2,9 | 1,5 |
| Mittelwert | 4,4 | 4,3 | 7,2 | 4,2 | 4,4 | 4,6 | 4,5 | 4,3 |
| ± StAbw. | ± 3,7 | ± 3,1 | ± 6,6 | ± 3,7 | ± 2,3 | ± 2,6 | ± 2,6 | ± 2,3 |
| | % CD62P positive Zellen [%] nach Stimulation mit 10 µM TRAP-6 | | | | | | | |
| 1 | 20,9 | 30,4 | 34,9 | 22,5 | 24,3 | 24,7 | 26,5 | 27,4 |
| 2 | 24,5 | 25,1 | 32,8 | 25,7 | 38,3 | 32,2 | 39,2 | 37,7 |
| 3 | 64,7 | 67,2 | 67,9 | 54,8 | 69,1 | 73,2 | 66,5 | 78,4 |
| 4 | 20,7 | 19,6 | 25,0 | 15,8 | 15,7 | 20,3 | 24,2 | 23,5 |
| 5 | 44,2 | 43,0 | 50,5 | 37,8 | 23,5 | 25,1 | 15,5 | 23,6 |
| 6 | 33,9 | 33,5 | 42,9 | 39,8 | 40,9 | 43,2 | 45,1 | 42,9 |
| 7 | 45,9 | 41,0 | 44,9 | 35,3 | 27,6 | 50,5 | 57,4 | 36,3 |
| 8 | 30,1 | 36,4 | 28,1 | 24,1 | 44,2 | 33,7 | 38,0 | 50,5 |
| 9 | 17,1 | 17,4 | 24,4 | 14,4 | 21,6 | 20,5 | 17,8 | 19,3 |
| 10 | 50,6 | 42,3 | 47,8 | 42,0 | 52,0 | 52,7 | 52,1 | 49,4 |
| 11 | 41,1 | 43,7 | 58,9 | 45,1 | 58,0 | 45,3 | | 44,6 |
| 12 | 22,7 | 19,9 | 24,8 | 28,5 | 20,1 | 17,9 | 15,7 | 23,1 |
| 13 | 44,8 | 49,4 | 52,8 | 32,4 | 53,5 | 51,5 | 64,4 | 39,6 |
| Mittelwert | 35,5 | 36,1 | 41,2 | 32,2 | 37,6 | 37,8 | 38,5 | 38,2 |
| ± StAbw. | ± 14,4 | ± 14,0 | ± 14,2* | ± 11,8 | ± 16,9 | ± 16,6 | ± 18,8 | ± 16,1 |

| | Teilstudie I: Thrombozytenreaktivität PAC-1 Laufband-Stufentest | | | | | | | |
|-------------------|--|---------------|----------------|---------------|------------------|---------------|---------------|---------------|
| | Laufband-Stufentest | | | | Kontrolle | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | % PAC-1 positive Zellen [%] nach Stimulation mit 2,5 µM ADP | | | | | | | |
| 1 | 49,4 | 43,3 | 58,0 | 40,9 | 57,6 | 51,6 | 65,6 | 53,0 |
| 2 | 41,8 | 36,4 | 40,4 | 35,4 | 41,2 | 41,4 | 44,4 | 41,9 |
| 3 | 15,4 | 22,3 | 35,0 | 16,1 | 52,5 | | 36,7 | 40,1 |
| 4 | 48,4 | 56,3 | 73,2 | 52,4 | 33,8 | 50,6 | 42,1 | 41,3 |
| 5 | 43,3 | 53,6 | 71,3 | 28,1 | 45,8 | 52,0 | 55,6 | 59,9 |
| 6 | 49,0 | 44,4 | 92,4 | 48,4 | 69,9 | 62,9 | 63,6 | 62,5 |
| 7 | 55,7 | 37,7 | 27,3 | 46,0 | 33,2 | 53,0 | 30,1 | 34,0 |
| 8 | 55,0 | 53,4 | 59,2 | 41,5 | 50,2 | 46,9 | 63,4 | 69,1 |
| 9 | 53,6 | 51,0 | 53,1 | 61,2 | 47,0 | 47,6 | 33,5 | 50,4 |
| 10 | 53,8 | 45,8 | 96,2 | 60,9 | 66,8 | 58,4 | 57,0 | 76,6 |
| 11 | 72,6 | 67,5 | 69,3 | 9,6 | 46,8 | 63,2 | 65,7 | 60,6 |
| 12 | 45,9 | 38,6 | 41,8 | 31,1 | | 62,0 | 57,8 | 55,7 |
| 13 | 23,0 | 40,9 | 37,2 | 27,4 | 27,9 | 24,7 | 32,8 | 28,6 |
| Mittelwert | 46,7 | 45,5 | 58,0 | 38,4 | 47,7 | 51,2 | 49,9 | 51,8 |
| ± StAbw. | ± 14,5 | ± 11,2 | ± 21,8* | ± 15,9 | ± 12,9 | ± 10,8 | ± 13,6 | ± 14,1 |
| | % PAC-1 positive Zellen [%] nach Stimulation mit 10 µM ADP | | | | | | | |
| 1 | 73,4 | 70,9 | 81,4 | 77,4 | 78,2 | 76,8 | 74,4 | 80,1 |
| 2 | 65,3 | 58,7 | 61,7 | 70,0 | 69,3 | 56,7 | 69,3 | 67,6 |
| 3 | 37,1 | 53,8 | 54,2 | 35,7 | 66,9 | | 86,7 | 59,7 |
| 4 | 72,7 | 81,8 | 82,5 | 81,5 | 68,4 | 81,3 | 72,2 | 78,1 |
| 5 | 84,2 | 78,3 | 76,0 | 69,3 | 82,0 | 86,4 | 83,9 | 85,5 |
| 6 | 70,3 | 72,6 | 82,3 | 81,2 | 83,0 | 79,1 | 86,4 | 89,3 |
| 7 | 46,4 | 74,5 | 69,7 | 67,4 | 71,5 | 69,9 | 60,0 | 69,0 |
| 8 | 77,7 | 77,6 | 74,9 | 74,5 | 66,1 | 72,7 | 83,9 | 82,6 |
| 9 | 77,0 | 65,5 | 76,8 | 79,0 | 46,0 | 78,5 | 47,9 | 73,9 |
| 10 | 75,7 | 79,6 | 80,6 | 85,0 | 78,8 | 80,9 | 79,6 | 83,1 |
| 11 | 88,9 | 83,5 | 86,9 | 89,2 | 82,4 | 83,5 | 83,1 | 83,7 |
| 12 | 80,7 | 73,3 | 75,0 | 68,9 | | 83,3 | 76,8 | 80,4 |
| 13 | 44,3 | 35,6 | 50,7 | 53,6 | 49,3 | 57,0 | 55,2 | 51,7 |
| Mittelwert | 68,8 | 69,7 | 73,3 | 71,7 | 70,2 | 75,5 | 73,8 | 75,7 |
| ± StAbw. | ± 16,2 | ± 13,4 | ± 11,2 | ± 14,2 | ± 12,2 | ± 9,9 | ± 12,6 | ± 11,0 |
| | % PAC-1 positive Zellen [%] nach Stimulation mit 10 µM TRAP-6 | | | | | | | |
| 1 | 10,6 | 8,5 | 21,2 | 12,9 | 14,3 | 14,7 | 17,6 | 14,4 |
| 2 | 15,9 | 11,9 | 13,2 | 10,0 | 18,5 | 14,6 | 13,5 | 17,9 |
| 3 | 22,4 | 26,7 | 21,7 | 17,7 | 27,0 | | 23,9 | 30,1 |
| 4 | 8,2 | 8,0 | 10,2 | 11,2 | 3,5 | 6,1 | 5,8 | 5,4 |
| 5 | 18,7 | 15,7 | 16,9 | 11,4 | 9,9 | 16,5 | 11,1 | 13,3 |
| 6 | 27,1 | 19,2 | 40,9 | 15,3 | 37,0 | 34,6 | 47,1 | 23,9 |
| 7 | 25,3 | 19,3 | 24,7 | 20,6 | 18,6 | 21,7 | 14,3 | 20,6 |
| 8 | 16,5 | 19,6 | 24,2 | 19,6 | 12,5 | 16,4 | 16,1 | 21,7 |
| 9 | 5,8 | 6,5 | 8,5 | 6,8 | 6,8 | 5,5 | 8,4 | 7,0 |
| 10 | 31,5 | 22,9 | 22,2 | 22,4 | 25,5 | 26,9 | 21,6 | 20,2 |
| 11 | 40,9 | 41,1 | 51,0 | 45,0 | 28,3 | 24,2 | 33,5 | 32,4 |
| 12 | 6,3 | 6,9 | 10,2 | 8,5 | | 13,3 | 10,6 | 9,9 |
| 13 | 16,5 | 10,0 | 18,0 | 13,8 | 14,2 | 17,2 | 21,1 | 15,2 |
| Mittelwert | 18,9 | 16,6 | 21,8 | 16,6 | 18,0 | 17,6 | 18,8 | 17,8 |
| ± StAbw. | ± 10,4 | ± 9,9 | ± 12,2* | ± 9,8 | ± 9,8 | ± 8,3 | ± 11,3 | ± 8,2 |

| | Teilstudie I: Thrombozytenreaktivität CD41/CD62P Rad-Stufentest | | | | | | | |
|-------------------|--|---------------|---------------|---------------|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | unfixiert | | | | nachträglich fixiert | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | MFI CD41-PE [dimensionslos] nach Stimulation mit 10 µM TRAP-6 | | | | | | | |
| 1 | 19,7 | 25,1 | 29,1 | 21,9 | 20,1 | 25,2 | 27,9 | 34,8 |
| 2 | 25,6 | 20,3 | 30,2 | 28,1 | 26,7 | 27,0 | 31,7 | 32,8 |
| 3 | 26,4 | 27,8 | 26,0 | 24,5 | 28,7 | 26,1 | 28,2 | 27,3 |
| 4 | 18,9 | 18,7 | 24,8 | 17,6 | 19,6 | 18,1 | 24,2 | 17,7 |
| 5 | 20,5 | 20,8 | 21,4 | 19,2 | 22,7 | 21,7 | 23,3 | 20,8 |
| 6 | 22,9 | 26,4 | 32,2 | 23,8 | 26,7 | 27,6 | 29,0 | 26,8 |
| 7 | 19,5 | 21,9 | 23,6 | 21,0 | 22,5 | 22,0 | 22,9 | 24,7 |
| 8 | 22,7 | 20,8 | 25,3 | 22,0 | 23,6 | 22,1 | 27,6 | 24,4 |
| 9 | 21,4 | 22,3 | 23,4 | 18,6 | 22,5 | 23,4 | 24,5 | 20,6 |
| 10 | 26,0 | 28,0 | 28,0 | 27,4 | 28,1 | 29,5 | 31,0 | 28,7 |
| 11 | 32,8 | 32,1 | 42,1 | 33,7 | 34,4 | 33,7 | 41,2 | 35,8 |
| 12 | 15,3 | 15,8 | 16,8 | 16,1 | 16,0 | | 18,7 | 17,9 |
| 13 | 27,2 | 25,1 | 26,7 | 22,6 | 28,9 | 26,4 | 25,9 | 24,5 |
| Mittelwert | 23,0 | 23,5 | 26,9 | 22,8 | 24,7 | 25,2 | 27,4 | 25,9 |
| ± StAbw. | ± 4,6 | ± 4,4 | ± 6,1 | ± 4,8 | ± 4,9 | ± 4,1 | ± 5,5 | ± 6,0 |
| | % CD62P positive Zellen [%] nach Stimulation mit 10 µM TRAP-6 | | | | | | | |
| 1 | 23,8 | 31,0 | 43,1 | 26,2 | 23,1 | 28,4 | 39,9 | 33,7 |
| 2 | 29,1 | 39,1 | 44,2 | 35,4 | 28,9 | 33,6 | 44,5 | 35,9 |
| 3 | 69,4 | 68,0 | 80,4 | 68,5 | 74,7 | 58,6 | 69,1 | 56,0 |
| 4 | 23,0 | 24,2 | 25,8 | 23,9 | 23,5 | 17,7 | 40,4 | 22,3 |
| 5 | 36,3 | 36,1 | 41,6 | 31,3 | 37,3 | 30,5 | 31,3 | 30,3 |
| 6 | 31,0 | 38,5 | 44,2 | 35,0 | 33,0 | 29,2 | 44,7 | 34,1 |
| 7 | 40,4 | 52,3 | 57,1 | 51,9 | 49,4 | 56,7 | 49,1 | 46,9 |
| 8 | 33,7 | 31,7 | 49,8 | 35,4 | 35,2 | 29,0 | 40,5 | 30,3 |
| 9 | 25,3 | 24,9 | 32,8 | 24,5 | 22,7 | 21,6 | 34,3 | 24,5 |
| 10 | 44,2 | 58,4 | 50,0 | 63,4 | 54,0 | 58,7 | 57,2 | 51,3 |
| 11 | 46,5 | 42,1 | 55,9 | 49,3 | 41,6 | 40,2 | 55,0 | 42,0 |
| 12 | 23,8 | 24,0 | 29,8 | 20,2 | 20,4 | | 26,6 | 21,5 |
| 13 | 51,0 | 58,2 | 55,5 | 54,3 | 55,6 | 51,8 | 41,9 | 42,0 |
| Mittelwert | 36,7 | 40,7 | 46,9 | 39,9 | 38,4 | 38,0 | 44,2 | 36,2 |
| ± StAbw. | ± 13,5 | ± 14,5 | ± 14,1 | ± 15,9 | ± 16,2 | ± 14,8 | ± 11,4 | ± 10,9 |

| | Teilstudie I: Thrombozytenreaktivität CD42b/PAC-1 Rad-Stufentest | | | | | | | |
|-------------------|---|---------------|---------------|---------------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | unfixiert | | | | nachträglich fixiert | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| Proband | MFI CD42b-PE [dimensionslos] nach Stimulation mit 10 µM ADP | | | | | | | |
| 1 | 29,3 | 32,9 | 33,9 | 30,7 | 30,2 | 34,1 | 33,1 | 29,7 |
| 2 | 25,3 | 25,3 | 25,8 | 26,0 | 25,4 | 25,5 | 29,1 | 27,1 |
| 3 | 26,6 | 27,6 | 26,5 | 26,2 | 27,6 | 30,2 | 28,5 | 28,2 |
| 4 | 24,7 | 24,3 | 24,5 | 24,1 | 25,4 | 26,0 | 26,1 | 25,1 |
| 5 | 27,9 | 29,1 | 28,8 | 28,2 | 28,6 | 30,6 | 29,5 | 28,5 |
| 6 | 26,8 | 27,8 | 27,8 | 28,6 | 27,3 | 28,8 | 28,1 | 28,8 |
| 7 | 23,5 | 25,1 | 25,8 | 23,3 | 20,3 | 24,2 | 25,2 | 24,4 |
| 8 | 25,5 | 23,5 | 24,4 | 25,2 | 27,0 | 24,5 | 25,5 | 25,4 |
| 9 | 27,1 | 27,8 | 24,7 | 25,7 | 27,6 | 27,4 | 27,9 | 26,0 |
| 10 | 25,9 | 25,1 | 27,0 | 25,6 | 27,0 | 26,3 | 27,8 | 27,3 |
| 11 | 20,5 | 19,7 | 20,6 | 19,9 | 20,7 | 20,6 | 21,9 | 21,1 |
| 12 | 22,8 | 23,8 | 24,2 | 24,8 | 24,9 | 24,3 | 25,7 | 24,6 |
| 13 | 27,9 | 25,3 | 25,2 | 26,7 | 26,6 | 26,9 | 25,4 | 27,3 |
| Mittelwert | 25,7 | 25,9 | 26,1 | 25,8 | 26,0 | 26,9 | 27,2 | 26,4 |
| ± StAbw. | ± 2,4 | ± 3,2 | ± 3,1 | ± 2,6 | ± 2,8 | ± 3,5 | ± 2,7 | ± 2,3 |
| | % PAC-1 positive Zellen [%] nach Stimulation mit 10 µM ADP | | | | | | | |
| 1 | 71,7 | 78,0 | 82,9 | 79,0 | 69,9 | 81,9 | 89,2 | 82,8 |
| 2 | 57,6 | 52,4 | 60,2 | 54,0 | 74,3 | 72,4 | 76,5 | 76,0 |
| 3 | 55,7 | 52,1 | 56,7 | 61,3 | 75,2 | 69,4 | 68,4 | 76,4 |
| 4 | 77,4 | 75,9 | 78,4 | 76,5 | 86,3 | 76,5 | 83,6 | 85,1 |
| 5 | 62,3 | 64,4 | 60,0 | 84,9 | 84,5 | 86,6 | 81,1 | 87,2 |
| 6 | 71,1 | 71,3 | 83,4 | 71,4 | 79,8 | 80,2 | 74,5 | 81,8 |
| 7 | 93,4 | 74,9 | 75,0 | 68,3 | 66,5 | 72,0 | 81,0 | 80,6 |
| 8 | 69,2 | 68,4 | 69,0 | 64,7 | 88,2 | 80,9 | 81,5 | 81,1 |
| 9 | 65,0 | 58,9 | 70,4 | 67,8 | 83,0 | 77,1 | 76,5 | 77,3 |
| 10 | 81,7 | 77,2 | 77,8 | 79,9 | 89,4 | 89,3 | 94,2 | 89,5 |
| 11 | 82,0 | 75,8 | 83,9 | 83,3 | 87,5 | 89,8 | 89,9 | 88,9 |
| 12 | 65,1 | 73,2 | 71,4 | 72,2 | 81,8 | 84,2 | 85,9 | 82,9 |
| 13 | 47,4 | 42,7 | 94,8 | 47,7 | 70,6 | 58,2 | 93,4 | 66,8 |
| Mittelwert | 69,2 | 66,6 | 74,1 | 70,1 | 79,8 | 78,3 | 82,7 | 81,3 |
| ± StAbw. | ± 12,4 | ± 11,5 | ± 11,0 | ± 11,1 | ± 7,7 | ± 8,9 | ± 7,7 | ± 6,2 |

| Proband | Teilstudie I: Probenstabilität | | | |
|---|--------------------------------|--------|--------|--------|
| | 0 min | 15 min | 30 min | 60 min |
| % CD62P positive Zellen [%] unfixiert ohne Stimulation | | | | |
| 1 | 1,12 | 0,97 | 1,28 | 1,46 |
| 2 | 1,18 | 1,38 | 1,23 | 1,48 |
| 3 | 1,09 | 1,10 | 1,22 | 1,07 |
| 4 | 1,01 | 1,06 | 1,20 | 1,12 |
| 5 | 1,23 | 1,28 | 1,43 | 1,68 |
| % CD62P positive Zellen [%] nachträglich fixiert ohne Stimulation | | | | |
| 1 | 0,65 | 1,05 | 1,27 | 1,47 |
| 2 | 0,98 | 0,97 | 1,17 | 1,35 |
| 3 | 1,12 | 1,22 | 1,06 | 1,57 |
| 4 | 1,22 | 1,22 | 1,48 | 1,73 |
| 5 | 1,11 | 0,93 | 1,26 | 1,42 |
| % PAC-1 positive Zellen [%] unfixiert ohne Stimulation | | | | |
| 1 | 1,22 | 0,74 | 0,58 | 0,84 |
| 2 | 1,04 | 1,02 | 1,24 | 1,56 |
| 3 | 1,30 | 1,34 | 1,54 | 1,54 |
| 4 | 1,56 | 1,22 | 1,18 | 1,36 |
| 5 | 1,60 | 1,54 | 1,60 | 1,56 |
| % PAC-1 positive Zellen [%] nachträglich fixiert ohne Stimulation | | | | |
| 1 | 2,72 | 4,04 | 6,56 | 10,00 |
| 2 | 2,52 | 3,68 | 4,88 | 7,66 |
| 3 | 2,32 | 3,70 | 4,74 | 6,14 |
| 4 | 2,04 | 3,32 | 4,62 | 7,32 |
| 5 | 2,42 | 3,18 | 5,24 | 7,78 |
| % CD62P positive Zellen [%] unfixiert nach Stimulation mit 5 µM ADP | | | | |
| 1 | 3,80 | 3,75 | 4,57 | 4,31 |
| 2 | 3,70 | 4,19 | 4,54 | 4,47 |
| 3 | 4,09 | 4,57 | 4,64 | 4,46 |
| 4 | 4,58 | 4,83 | 5,35 | 5,45 |
| 5 | 4,74 | 4,82 | 5,62 | 5,41 |
| % CD62P positive Zellen [%] unfixiert nach Stimulation mit 10 µM TRAP-6 | | | | |
| 1 | 57,60 | 57,60 | 56,70 | 56,80 |
| 2 | 55,80 | 55,40 | 55,80 | 55,30 |
| 3 | 25,90 | 27,60 | 27,50 | 28,20 |
| 4 | 46,80 | 47,40 | 46,00 | 46,00 |
| 5 | 52,80 | 52,30 | 52,10 | 51,80 |

Rohdaten Teilstudie II

| Probanden | Teilstudie II: anthropometrische Daten | | | | |
|-------------------|--|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| | Alter [Jahre] | Größe [cm] | Gewicht [kg] | Körperfett [%] | rel. Herzvolumen [ml/kg] |
| 1 | 40 | 178 | 82 | 20,5 | 10,8 |
| 2 | 23 | 184 | 80 | 12,0 | 12,4 |
| 3 | 23 | 185 | 73 | 10,4 | 10,5 |
| 4 | 35 | 180 | 68 | 10,4 | 11,9 |
| 5 | 30 | 186 | 82 | 9,1 | 11,8 |
| 6 | 21 | 182 | 75 | 8,1 | 11,0 |
| 7 | 27 | 172 | 65 | 12,2 | 12,8 |
| 8 | 25 | 185 | 88 | 12,2 | 11,2 |
| 9 | 25 | 177 | 81 | 19,1 | 10,7 |
| 10 | 22 | 184 | 78 | 13,2 | 10,5 |
| 11 | 25 | 177 | 66 | 15,6 | 10,9 |
| 12 | 23 | 190 | 85 | 16,3 | 11,7 |
| 13 | 40 | 192 | 96 | 16,8 | 10,8 |
| 14 | 22 | 189 | 79 | 5,7 | 10,5 |
| 15 | 26 | 173 | 72 | 13,8 | 9,6 |
| 16 | 21 | 176 | 78 | 10,4 | 11,3 |
| 17 | 23 | 183 | 82 | 9,1 | 10,9 |
| Mittelwert | 27 | 182 | 78 | 12,6 | 11,1 |
| StAbw. | ± 6 | ± 6 | ± 8 | ± 4,0 | ± 0,8 |

| Probanden | Teilstudie II: Ergebnisse Leistungsbeurteilung | | | | | |
|-------------------|--|---------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|
| | V _{max} [m/s] | V _{IAS} [m/s] | VO _{2max} [ml/min] | rel. VO _{2max} [ml/min/kg] | Laktat _{max} [mmol/l] | HF _{max} [l/min] |
| 1 | 4,3 | 3,4 | 3526 | 43,0 | 8,6 | / |
| 2 | 4,5 | 3,4 | 4320 | 54,0 | 9,2 | / |
| 3 | 4,5 | 3,6 | 4300 | 58,9 | 8,6 | / |
| 4 | 4,0 | 3,0 | 3550 | 52,2 | 12,0 | / |
| 5 | 5,0 | 4,2 | 4920 | 60,0 | 9,0 | / |
| 6 | 5,0 | 4,0 | 4726 | 62,6 | 8,1 | / |
| 7 | 4,5 | 3,6 | 4316 | 66,4 | 9,2 | / |
| 8 | 4,5 | 3,3 | 5174 | 58,8 | 8,6 | / |
| 9 | 4,0 | 3,3 | 4148 | 50,9 | 8,2 | / |
| 10 | 4,3 | 3,0 | 3955 | 50,7 | 9,9 | / |
| 11 | 4,3 | 3,3 | 3491 | 52,9 | 10,0 | / |
| 12 | 4,0 | 3,1 | 4361 | 51,3 | 10,1 | / |
| 13 | 3,9 | 2,8 | 5318 | 55,4 | 9,2 | / |
| 14 | 4,5 | 3,8 | 4969 | 62,9 | 8,6 | / |
| 15 | 4,3 | 3,3 | 4147 | 58,0 | 10,1 | / |
| 16 | 4,5 | 3,9 | 4906 | 63,3 | 7,4 | / |
| 17 | 4,5 | 3,1 | 4699 | 57,3 | 13,0 | / |
| Mittelwert | 4,4 | 3,5 | 4350 | 56,4 | 9,4 | / |
| StAbw. | ± 0,3 | ± 0,4 | ± 590 | ± 5,9 | ± 1,3 | / |

| Probanden | Teilstudie II: Ergometriedaten | | | | |
|------------|--------------------------------|----------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Geschwindigkeit [m/s] | Dauer [min] | Strecke [km] | Laktat _{Ruhe} [mmol/l] | Laktat _{Bel.} [mmol/l] |
| 1 | 3,01 | 80 | 14,5 | 1,26 | 1,61 |
| 2 | 3,04 | 75 | 13,7 | 1,11 | 3,66 |
| 3 | 3,26 | 60 | 11,7 | 1,88 | 4,57 |
| 4 | 2,65 | 75 | 11,9 | 1,12 | 2,65 |
| 5 | 3,81 | 120 | 27,4 | 1,20 | 2,48 |
| 6 | 3,60 | 60 | 13,0 | 1,32 | 1,87 |
| 7 | 3,21 | 75 | 14,5 | 1,66 | 3,20 |
| 8 | 2,99 | 100 | 17,9 | 1,67 | 2,83 |
| 9 | 2,94 | 60 | 10,6 | 1,21 | 4,01 |
| 10 | 2,67 | 60 | 9,6 | 1,38 | 5,35 |
| 11 | 2,93 | 90 | 15,8 | 1,49 | 2,30 |
| 12 | 2,76 | 80 | 13,3 | 1,50 | 2,83 |
| 13 | 2,48 | 120 | 17,8 | 1,07 | 1,40 |
| 14 | 3,40 | 60 | 12,2 | 1,12 | 1,87 |
| 15 | 2,93 | 60 | 10,5 | 1,38 | 4,69 |
| 16 | 3,48 | 65 | 13,6 | 2,02 | 3,76 |
| 17 | 2,77 | 70 | 11,6 | 1,23 | 2,74 |
| Mittelwert | 3,1 | 77 | 14,1 | 1,4 | 3,1 |
| StAbw. | ± 0,4 | ± 22 | ± 4,2 | ± 0,3 | ± 1,1 |

| Probanden | Teilstudie II: Thrombozytendaten | | | | | |
|------------|----------------------------------|-----------|----------|---------------------------------------|-----------|----------|
| | Thrombozytenzahl [Gpt/l] | | | mittleres Thrombozytenvolumen [fl] | | |
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| 1 | 186 | 263 | 191 | 6,1 | 6,0 | 6,0 |
| 2 | 208 | 335 | 234 | 6,6 | 6,7 | 6,3 |
| 3 | 257 | 391 | 264 | 6,0 | 6,1 | 5,8 |
| 4 | 230 | 329 | 243 | 6,5 | 6,1 | 6,4 |
| 5 | 157 | 261 | 161 | 6,1 | 5,8 | 6,1 |
| 6 | 153 | 243 | 167 | 7,3 | 7,4 | 7,4 |
| 7 | 247 | 323 | 254 | 6,0 | 6,0 | 6,4 |
| 8 | 275 | 365 | 287 | 5,5 | 5,7 | 5,9 |
| 9 | 251 | 285 | 252 | 6,0 | 5,8 | 5,8 |
| 10 | 143 | 207 | 137 | 6,4 | 7,0 | 6,6 |
| 11 | 244 | 317 | 240 | 6,4 | 7,1 | 6,6 |
| 12 | 264 | 373 | 278 | 5,6 | 5,7 | 5,7 |
| 13 | 213 | 264 | 216 | 6,2 | 6,5 | 6,5 |
| 14 | 180 | 268 | 195 | 6,1 | 6,6 | 6,4 |
| 15 | 204 | 303 | 220 | 6,4 | 7,2 | 6,8 |
| 16 | 134 | 223 | 147 | 6,7 | 6,9 | 7,0 |
| 17 | 227 | 348 | 239 | 5,6 | 5,8 | 6,0 |
| Mittelwert | 210 | 300 | 219 | 6,21 | 6,38 | 6,34 |
| StAbw. | ± 45 | ± 54 | ± 46 | ± 0,45 | ± 0,58 | ± 0,46 |

| Probanden | Teilstudie II: Blutbildveränderungen | | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|
| | Leukozyten [Gpt/l] | | | Granulozyten [Gpt/l] | | |
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| 1 | 5,7 | 9,5 | 7,9 | 3,5 | 4,4 | 5,7 |
| 2 | 8,3 | 16,0 | 14,7 | 5,6 | 10,0 | 12,1 |
| 3 | 4,1 | 7,7 | 12,7 | 2,0 | 3,3 | 10,6 |
| 4 | 4,9 | 9,3 | 12,0 | 2,3 | 3,9 | 9,4 |
| 5 | 4,7 | 13,5 | 9,4 | 1,9 | 6,4 | 7,5 |
| 6 | 4,4 | 8,2 | 8,5 | 2,8 | 4,8 | 6,7 |
| 7 | 6,8 | 10,1 | 8,1 | 3,2 | 4,4 | 5,8 |
| 8 | 4,3 | 8,7 | 13,0 | 2,0 | 5,1 | 10,9 |
| 9 | 5,1 | 7,3 | 10,6 | 2,9 | 4,5 | 8,8 |
| 10 | 5,8 | 9,1 | 7,8 | 3,2 | 4,0 | 6,1 |
| 11 | 4,1 | 8,5 | 9,8 | 2,2 | 5,5 | 8,2 |
| 12 | 5,1 | 11,5 | 11,3 | 2,6 | 6,4 | 8,6 |
| 13 | 5,1 | 6,7 | 8,3 | 2,9 | 4,0 | 5,9 |
| 14 | 3,2 | 6,4 | 9,8 | 1,5 | 3,2 | 8,1 |
| 15 | 4,3 | 10,0 | 9,3 | 2,5 | 4,3 | 7,1 |
| 16 | 4,8 | 11,2 | 10,4 | 2,6 | 6,0 | 8,5 |
| 17 | 4,4 | 8,7 | 8,4 | 2,5 | 5,4 | 6,6 |
| Mittelwert | 5,0 | 9,6 | 10,1 | 2,7 | 5,0 | 8,0 |
| StAbw. | ± 1,2 | ± 2,4 | ± 2,0 | ± 0,9 | ± 1,6 | ± 1,9 |
| | Monozyten [Gpt/l] | | | Lymphozyten [Gpt/l] | | |
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| 1 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 1,7 | 4,4 | 1,7 |
| 2 | 0,7 | 0,9 | 0,6 | 2,1 | 5,2 | 2,0 |
| 3 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 1,7 | 3,8 | 1,5 |
| 4 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 2,2 | 4,9 | 2,0 |
| 5 | 0,4 | 0,7 | 0,5 | 2,5 | 6,3 | 1,4 |
| 6 | 0,4 | 0,7 | 0,6 | 1,2 | 2,7 | 1,2 |
| 7 | 0,5 | 0,9 | 0,6 | 3,1 | 4,9 | 1,7 |
| 8 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | 1,8 | 2,9 | 1,4 |
| 9 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 1,9 | 2,6 | 1,5 |
| 10 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 2,2 | 4,4 | 1,4 |
| 11 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 1,6 | 2,5 | 1,1 |
| 12 | 0,4 | 0,7 | 0,8 | 2,1 | 4,5 | 1,9 |
| 13 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 1,7 | 2,4 | 2,0 |
| 14 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 1,4 | 2,8 | 1,2 |
| 15 | 0,3 | 0,7 | 0,6 | 1,5 | 5,1 | 1,6 |
| 16 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 1,8 | 4,6 | 1,3 |
| 17 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 1,6 | 2,8 | 1,5 |
| Mittelwert | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 1,6 | 3,9 | 1,6 |
| StAbw. | ± 0,1 | ± 0,2 | ± 0,1 | ± 0,5 | ± 1,2 | ± 0,3 |

| Probanden | Teilstudie II: Thrombozytenaktivität | | | | | |
|-------------------|--------------------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | % CD62P positive Zellen [%] | | | MFI CD41-PE [dimensionslos] | | |
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| 1 | 1,9 | 2,5 | 2,8 | 11,1 | 12,1 | 10,6 |
| 2 | 1,4 | 1,2 | 1,2 | 9,6 | 10,6 | 9,5 |
| 3 | 1,4 | 0,8 | 1,7 | 14,2 | 11,0 | 15,1 |
| 4 | 2,4 | 2,8 | 2,1 | 10,0 | 10,3 | 10,3 |
| 5 | 2,9 | 3,3 | 2,8 | 12,3 | 13,2 | 10,9 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | 1,4 | 0,7 | 1,6 | 11,8 | 11,4 | 10,9 |
| 8 | 2,4 | 1,8 | 1,4 | 9,8 | 9,2 | 10,8 |
| 9 | 1,3 | 1,8 | 1,0 | 10,2 | 11,8 | 10,5 |
| 10 | 1,0 | 1,6 | 1,5 | 13,1 | 11,8 | 10,5 |
| 11 | 1,4 | 0,9 | 1,1 | 11,4 | 11,2 | 13,3 |
| 12 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 11,7 | 10,7 | 9,6 |
| 13 | 2,3 | 1,7 | 1,4 | 12,6 | 10,6 | 12,5 |
| 14 | 1,7 | 3,0 | 2,7 | 11,5 | 11,2 | 12,5 |
| 15 | 1,6 | 1,6 | 1,8 | 10,0 | 10,6 | 9,4 |
| 16 | 1,0 | 1,8 | 1,7 | 11,4 | 10,8 | 9,9 |
| 17 | 1,3 | 1,1 | 1,5 | 12,1 | 11,2 | 10,8 |
| Mittelwert | 1,6 | 1,7 | 1,7 | 11,4 | 11,0 | 11,0 |
| StAbw. | ± 0,7 | ± 0,8 | ± 0,6 | ± 1,0 | ± 0,7 | ± 1,3 |

| Probanden | Teilstudie II: Thrombozytenreaktivität nach Stimulation mit 7,5 µM TRAP-6 | | | | | |
|-------------------|---|---------------|---------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| | % CD62P positive Zellen [%] | | | MFI CD41-PE [dimensionslos] | | |
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| 1 | 49,8 | 49,0 | 61,0 | 20,4 | 18,1 | 21,0 |
| 2 | 62,6 | 51,1 | 35,2 | 20,9 | 20,6 | 21,6 |
| 3 | 39,9 | 60,8 | 54,2 | 24,2 | 26,3 | 21,4 |
| 4 | 18,9 | 30,5 | 22,3 | 13,5 | 17,8 | 14,5 |
| 5 | 33,6 | 39,5 | 47,6 | 15,8 | 20,9 | 20,0 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | 28,7 | 36,4 | 19,1 | 20,0 | 21,5 | 17,4 |
| 8 | 18,7 | 16,6 | 16,2 | 11,1 | 10,7 | 12,4 |
| 9 | 18,9 | 22,3 | 18,4 | 13,7 | 16,5 | 14,8 |
| 10 | 35,4 | 57,9 | 43,7 | 19,8 | 17,8 | 18,7 |
| 11 | 33,2 | 36,9 | 38,4 | 18,9 | 17,7 | 26,4 |
| 12 | 28,2 | 27,7 | 25,9 | 12,5 | 12,4 | 17,3 |
| 13 | 44,2 | 52,7 | 49,1 | 19,3 | 19,6 | 20,9 |
| 14 | 23,5 | 30,9 | 29,9 | 17,0 | 19,0 | 20,1 |
| 15 | 29,9 | 40,2 | 34,7 | 18,0 | 17,1 | 20,8 |
| 16 | 26,5 | 25,1 | 21,1 | 15,6 | 17,0 | 12,7 |
| 17 | 7,9 | 9,1 | 8,2 | 14,0 | 14,0 | 19,6 |
| Mittelwert | 31,9 | 37,4 | 32,2 | 16,4 | 16,7 | 18,3 |
| StAbw. | ± 13,5 | ± 15,0 | ± 15,3 | ± 3,1 | ± 3,2 | ± 4,0 |

| Probanden | Teilstudie II: Thrombozyten-Leukozyten Konjugate [%] | | |
|-------------------|--|--------------|--------------|
| | Ruhe | Belastung | 2 h Ruhe |
| 1 | 9,1 | 6,3 | 5,3 |
| 2 | 8,0 | 8,5 | 8,5 |
| 3 | 13,9 | 16,0 | 13,3 |
| 4 | | | |
| 5 | | | |
| 6 | 7,1 | 22,1 | 13,4 |
| 7 | 6,9 | 8,3 | 12,0 |
| 8 | 10,6 | 18,7 | 7,6 |
| 9 | 17,1 | 27,7 | 16,2 |
| 10 | 14,9 | 22,0 | 11,2 |
| 11 | 18,1 | 18,9 | 19,3 |
| 12 | 10,2 | 9,3 | 9,6 |
| 13 | 11,7 | 14,0 | 6,9 |
| 14 | 12,4 | 16,1 | 17,0 |
| 15 | 14,5 | 23,5 | 15,3 |
| 16 | 6,5 | 7,5 | 8,4 |
| 17 | 14,4 | 22,9 | 13,9 |
| Mittelwert | 11,7 | 16,1 | 11,9 |
| StAbw. | ± 3,7 | ± 6,8 | ± 4,7 |

| Probanden | Teilstudie II: Thrombozytenaktivität nach Erythrozytenlyse | |
|-------------------|--|------------------|
| | % CD62P positive Thrombozyten | |
| | unfixiert | Erythrozytenlyse |
| 1 | 2,3 | 3,1 |
| 2 | 3,2 | 4,4 |
| 3 | 3,3 | 2,4 |
| 4 | 2,4 | 5,2 |
| 5 | 3,4 | 6,1 |
| 6 | 2,8 | 12,6 |
| 7 | 2,7 | 5,1 |
| 8 | 2,4 | 17,6 |
| 9 | 1,1 | 5,9 |
| Mittelwert | 2,6 | 6,9 |
| StAbw. | ± 0,7 | ± 4,9 |

| Probanden | Teilstudie II: Probenstabilität Konjugate [%] | | |
|-------------------|---|--------------|--------------|
| | 0 min | 20 min | 60 min |
| 1 | 9,6 | 11,2 | 14,5 |
| 2 | 10,2 | 13,2 | 16,5 |
| 3 | 8,9 | 11,4 | 13,6 |
| 4 | 9,7 | 12,6 | 14,8 |
| 5 | 10,1 | 11,9 | 15,0 |
| 6 | 10,3 | 12,5 | 15,7 |
| 7 | 11,2 | 13,1 | 15,8 |
| 8 | 9,9 | 11,6 | 14,8 |
| 9 | 13,3 | 13,4 | 15,7 |
| 10 | 11,0 | 13,5 | 16,4 |
| Mittelwert | 10,4 | 12,4 | 15,3 |
| StAbw. | ± 1,2 | ± 0,9 | ± 0,9 |

Rohdaten Teilstudie III:

| Probanden | Teilstudie III: anthropometrische Daten | | | | |
|---------------------|---|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|
| | Alter [Jahre] | Größe [cm] | Gewicht [kg] | Körperfett [%] | rel. Herzvolumen [ml/kg] |
| 1 | 25 | 180 | 74 | 14.8 | 10.6 |
| 2 | 21 | 175 | 76 | 13.5 | 11.5 |
| 3 | 26 | 175 | 75 | 20.1 | 9.9 |
| 4 | 22 | 174 | 64 | 8.7 | 9.7 |
| 5 | 24 | 172 | 73 | 14.3 | 9.1 |
| 6 | 23 | 186 | 64 | 10.2 | 13.1 |
| 7 | 24 | 163 | 62 | 20.2 | 10.5 |
| 8 | 23 | 182 | 73 | 9.4 | 11.4 |
| 9 | 24 | 172 | 65 | 17.9 | 10.8 |
| 10 | 22 | 197 | 87 | 8.1 | 11.9 |
| 11 | 24 | 173 | 64 | 8.7 | 12.8 |
| 12 | 27 | 178 | 72 | 7.1 | 13.7 |
| 13 | 20 | 178 | 65 | 7.7 | 11.5 |
| 14 | 26 | 183 | 79 | 16.4 | 11.8 |
| 15 | 26 | 176 | 69 | 10.0 | 11.3 |
| Mittelwert | 24 | 178 | 71 | 12.5 | 11.3 |
| Standardabw. | ±2 | ±7 | ±7 | ±4.4 | ±1.2 |

| Probanden | Teilstudie III: Ergebnisse Leistungsbeurteilung | | | | | |
|---------------------|---|------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|
| | P _{max} [W] | IAS [W] | VO2 _{max} [ml/min] | rel. VO2 _{max} [ml/min/kg] | Laktat _{max} [mmol/l] | HF _{max} [1/min] |
| 1 | 275 | 184 | 3870 | 52.3 | 13.1 | 198 |
| 2 | 325 | 225 | 4697 | 61.8 | 13.8 | 186 |
| 3 | 225 | 92 | 3428 | 45.7 | 17.3 | 194 |
| 4 | 260 | 167 | 3789 | 59.2 | 13.0 | 184 |
| 5 | 250 | 170 | 3431 | 47.0 | 11.8 | 185 |
| 6 | 251 | 178 | 4051 | 63.3 | 14.8 | 194 |
| 7 | 175 | 95 | 2740 | 44.2 | 10.7 | 200 |
| 8 | 217 | 143 | 3752 | 51.4 | 13.5 | 182 |
| 9 | 208 | 98 | 2997 | 46.1 | 13.7 | 196 |
| 10 | 450 | 343 | 5620 | 64.6 | 11.8 | 174 |
| 11 | 233 | 145 | 3539 | 55.3 | 6.0 | 179 |
| 12 | 350 | 258 | 4457 | 61.9 | 7.2 | 155 |
| 13 | 350 | 258 | 4602 | 70.8 | 12.2 | 197 |
| 14 | 305 | 210 | 4092 | 51.8 | 10.3 | 197 |
| 15 | 333 | 222 | 4547 | 65.9 | 9.1 | 183 |
| Mittelwert | 281 | 186 | 3980 | 56.1 | 11.9 | 189 |
| Standardabw. | ±69 | ±67 | ±710 | ±8.2 | ±2.8 | ±12 |

| Teilstudie III: Laktatwerte [mmol/l] | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 3 min | 5 min | 10 min | 60 min |
| 90-Sekunden Test | | | | | | | |
| 1 | 0,77 | 1,01 | 12,48 | 15,17 | 15,67 | 12,62 | 3,98 |
| 2 | 0,90 | 0,90 | 13,73 | 16,00 | 17,03 | 15,33 | 2,38 |
| 3 | 0,76 | 0,89 | 10,93 | 15,63 | 17,35 | 16,72 | 4,23 |
| 4 | 1,89 | 1,45 | 10,73 | 15,24 | 16,66 | 15,94 | 3,48 |
| 5 | 1,16 | 1,05 | 11,17 | 14,46 | 15,55 | 13,48 | 3,65 |
| 6 | 0,89 | 0,76 | 16,17 | 15,52 | 17,26 | 18,82 | 3,98 |
| 7 | 1,24 | 1,00 | 10,66 | 13,42 | 13,86 | 11,14 | 2,28 |
| 8 | 1,07 | 1,31 | 13,06 | 14,57 | 15,22 | 11,35 | 2,71 |
| 9 | 1,43 | 1,36 | 9,32 | 12,30 | 13,13 | 9,57 | 1,85 |
| 10 | 0,68 | 0,78 | 12,77 | 14,88 | 15,30 | 14,11 | 3,17 |
| 11 | 0,79 | 0,82 | | 14,73 | 15,79 | 16,50 | 5,01 |
| 12 | 1,37 | 1,05 | 9,42 | 12,73 | 13,56 | 12,45 | 2,96 |
| 13 | 0,77 | 0,86 | 8,78 | 11,72 | 12,44 | 9,63 | 2,37 |
| 14 | 0,69 | 0,71 | 7,21 | 12,75 | 14,39 | 14,66 | 4,35 |
| 15 | 1,09 | 0,64 | 7,85 | 13,23 | 14,51 | 12,25 | 2,20 |
| Mittelwert ± StAbw. | 1,0 ± 0,3 | 1,0 ± 0,2 | 11,0 ± 5 | 14,2 ± 1,4 | 15,1 ± 1,6 | 13,6 ± 2,7 | 3,2 ± 0,9 |
| Kontrolle | | | | | | | |
| 1 | 1,01 | | 0,94 | | | | |
| 2 | 0,88 | | 0,93 | | | | |
| 3 | 1,36 | | 1,16 | | | | |
| 4 | 1,75 | | 1,11 | | | | |
| 5 | 0,99 | | 0,85 | | | | |
| 6 | 0,96 | | 1,09 | | | | |
| 7 | 0,97 | | 0,93 | | | | |
| 8 | 1,03 | | 1,18 | | | | |
| 9 | 0,57 | | 0,71 | | | | |
| 10 | 1,24 | | 1,02 | | | | |
| 11 | 0,83 | | 0,76 | | | | |
| 12 | 2,23 | | 1,30 | | | | |
| 13 | 0,60 | | 0,57 | | | | |
| 14 | 0,63 | | 0,71 | | | | |
| 15 | 2,13 | | 1,22 | | | | |
| Mittelwert ± StAbw. | 1,1 ± 0,5 | / | 1,0 ± 0,2 | / | / | / | / |

| | Teilstudie III: Adrenalin [pg/ml] | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 21 | 58 | 1401 | 53 | 29 |
| 2 | 13 | 18 | 1089 | 41 | 18 |
| 3 | 170 | 233 | 2399 | 269 | 144 |
| 4 | 2 | 3 | 1072 | 77 | 9 |
| 5 | 33 | 50 | 2164 | 33 | 16 |
| 6 | 13 | 39 | 2605 | 107 | 34 |
| 7 | 144 | 105 | 261 | 199 | 55 |
| 8 | 61 | 65 | 1209 | 43 | 38 |
| 9 | 37 | 65 | 620 | 37 | 28 |
| 10 | 17 | 57 | 2354 | 77 | 68 |
| 11 | 9 | 28 | 876 | 95 | 21 |
| 12 | 8 | 14 | 469 | 12 | 9 |
| 13 | 11 | 27 | 806 | 23 | 19 |
| 14 | 9 | 19 | 120 | 68 | 18 |
| 15 | 15 | 71 | 786 | 49 | 11 |
| Mittelwert ± StAbw. | 38 ± 51 | 57 ± 56 | 1215 ± 806 | 79 ± 69 | 34 ± 35 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 41 | 68 | 40 | 33 | 27 |
| 2 | 13 | 23 | 14 | 10 | 9 |
| 3 | 77 | 77 | 90 | 100 | 45 |
| 4 | 21 | 36 | 16 | 7 | 12 |
| 5 | 12 | 24 | 11 | 13 | 10 |
| 6 | 51 | 111 | 25 | 61 | 30 |
| 7 | 107 | 279 | 274 | 178 | 149 |
| 8 | 26 | 81 | 30 | 28 | 12 |
| 9 | 56 | 60 | 72 | 72 | 48 |
| 10 | 13 | 42 | 24 | 9 | 10 |
| 11 | 20 | 31 | 13 | 10 | 10 |
| 12 | 11 | 17 | 10 | 10 | 14 |
| 13 | 17 | 17 | 11 | 12 | 39 |
| 14 | 13 | 42 | 18 | 11 | 22 |
| 15 | 40 | 48 | 35 | 39 | 55 |
| Mittelwert ± StAbw. | 35 ± 28 | 64 ± 65 | 46 ± 67 | 40 ± 47 | 33 ± 36 |

| | Teilstudie III: Noradrenalin [pg/ml] | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 301 | 530 | 10066 | 1464 | 539 |
| 2 | 126 | 297 | 10148 | 843 | 255 |
| 3 | 232 | 398 | 14120 | 1788 | 436 |
| 4 | 124 | 541 | 13114 | 1840 | 58 |
| 5 | 704 | 870 | 8917 | 1897 | 910 |
| 6 | 403 | 767 | 11236 | 1909 | 453 |
| 7 | 215 | 607 | 3079 | 650 | 293 |
| 8 | 411 | 732 | 13689 | 874 | 326 |
| 9 | 214 | 596 | 4554 | 624 | 326 |
| 10 | 93 | 654 | 11217 | 994 | 234 |
| 11 | 256 | 383 | 6068 | 1041 | 354 |
| 12 | 74 | 448 | 10153 | 461 | 91 |
| 13 | 265 | 1018 | 17949 | 230 | 574 |
| 14 | 252 | 632 | 7063 | 1627 | 446 |
| 15 | 515 | 922 | 7006 | 1988 | 563 |
| Mittelwert ± StAbw. | 279 ± 170 | 626 ± 207 | 9892 ± 3947 | 1215 ± 600 | 291 ± 212 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 306 | 641 | 734 | 393 | 321 |
| 2 | 171 | 361 | 211 | 198 | 199 |
| 3 | 152 | 442 | 363 | 166 | 214 |
| 4 | 327 | 654 | 559 | 380 | 355 |
| 5 | 873 | 1075 | 1007 | 716 | 805 |
| 6 | 167 | 441 | 346 | 198 | 201 |
| 7 | 247 | 298 | 212 | 124 | 139 |
| 8 | 263 | 612 | 476 | 273 | 250 |
| 9 | 295 | 772 | 300 | 293 | 296 |
| 10 | 197 | 713 | 856 | 266 | 178 |
| 11 | 239 | 396 | 339 | 145 | 191 |
| 12 | 55 | 442 | 397 | 69 | 56 |
| 13 | 187 | 1087 | 703 | 278 | 282 |
| 14 | 267 | 753 | 558 | 286 | 280 |
| 15 | 334 | 734 | 996 | 388 | 377 |
| Mittelwert ± StAbw. | 272 ± 183 | 628 ± 240 | 537 ± 267 | 278 ± 155 | 276 ± 169 |

| | Teilstudie III: Thrombozytenzahl [Gpt/l] | | | | |
|-------------------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 144 | 145 | 161 | 173 | 143 |
| 2 | 257 | 260 | 265 | 309 | 234 |
| 3 | 233 | 252 | 225 | 298 | 243 |
| 4 | 202 | 223 | 221 | 252 | 200 |
| 5 | 283 | 332 | 308 | 345 | 307 |
| 6 | 125 | 134 | 159 | 153 | 146 |
| 7 | 253 | 280 | 286 | 320 | 254 |
| 8 | 142 | 143 | 153 | 146 | 149 |
| 9 | 230 | 204 | 240 | 252 | 216 |
| 10 | 199 | 200 | 224 | 228 | 179 |
| 11 | 252 | 263 | 272 | 328 | 276 |
| 12 | 191 | 208 | 214 | 217 | 185 |
| 13 | 159 | 179 | 203 | 189 | 168 |
| 14 | 223 | 249 | 246 | 281 | 230 |
| 15 | 219 | 253 | 250 | 281 | 228 |
| Mittelwert | 214 | 229 | 236 | 260 | 211 |
| ± StAbw. | ± 48 | ± 60 | ± 47 | ±66 | ± 50 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 135 | 167 | 149 | 141 | 156 |
| 2 | 231 | 241 | 233 | 261 | 233 |
| 3 | 249 | 259 | 284 | 247 | 257 |
| 4 | 192 | 211 | 221 | 209 | 201 |
| 5 | 322 | 340 | 355 | 343 | 329 |
| 6 | 121 | 131 | 133 | 106 | 133 |
| 7 | 239 | 264 | 248 | 253 | 250 |
| 8 | 139 | 165 | 152 | 145 | 152 |
| 9 | 187 | 195 | 202 | 183 | 191 |
| 10 | 220 | 239 | 226 | 204 | 216 |
| 11 | 249 | 275 | 283 | 277 | 268 |
| 12 | 173 | 195 | 199 | 176 | 183 |
| 13 | 165 | 171 | 176 | 174 | 173 |
| 14 | 164 | 220 | 203 | 205 | 192 |
| 15 | 209 | 225 | 241 | 232 | 229 |
| Mittelwert | 206 | 226 | 227 | 217 | 212 |
| ± StAbw. | ± 54 | ± 54 | ± 60 | ± 62 | ± 52 |

| | Teilstudie III: mittleres Thrombozytenvolumen MPV [fl] | | | | |
|--------------------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 6,7 | 6,4 | 6,4 | 6,9 | 6,6 |
| 2 | 6,0 | 6,2 | 6,7 | 6,1 | 6,6 |
| 3 | 6,1 | 5,9 | 7,3 | 7,0 | 6,2 |
| 4 | 6,1 | 6,0 | 7,4 | 6,7 | 6,3 |
| 5 | 6,2 | 5,3 | 6,6 | 6,3 | 5,6 |
| 6 | 7,0 | 7,4 | 7,3 | 7,0 | 7,0 |
| 7 | 5,5 | 5,3 | 6,2 | 5,4 | 5,6 |
| 8 | 6,9 | 7,0 | 6,9 | 8,2 | 7,6 |
| 9 | 6,1 | 7,1 | 7,5 | 6,5 | 6,3 |
| 10 | 5,2 | 5,9 | 5,5 | 5,4 | 5,5 |
| 11 | 5,2 | 5,7 | 5,9 | 5,4 | 5,2 |
| 12 | 5,2 | 5,3 | 5,3 | 5,4 | 5,4 |
| 13 | 6,4 | 6,2 | 5,9 | 6,2 | 5,9 |
| 14 | 6,6 | 6,4 | 7,1 | 7,1 | 6,8 |
| 15 | 5,7 | 6,0 | 6,6 | 6,0 | 5,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,06 ± 0,60 | 6,14 ± 0,65 | 6,57 ± 0,70 | 6,37 ± 0,81 | 6,15 ± 0,68 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 6,7 | 6,8 | 7,7 | 6,7 | 6,5 |
| 2 | 6,1 | 7,1 | 7,2 | 6,0 | 6,1 |
| 3 | 5,4 | 5,6 | 5,5 | 5,4 | 5,7 |
| 4 | 6,9 | 6,4 | 6,4 | 6,6 | 6,2 |
| 5 | 6,0 | 6,2 | 5,4 | 5,5 | 5,9 |
| 6 | 6,9 | 7,6 | 6,9 | 7,3 | 7,6 |
| 7 | 5,4 | 5,1 | 5,6 | 5,2 | 5,3 |
| 8 | 7,4 | 6,5 | 6,6 | 6,5 | 6,3 |
| 9 | 5,9 | 6,3 | 6,3 | 6,3 | 6,0 |
| 10 | 5,3 | 5,6 | 6,2 | 5,9 | 5,7 |
| 11 | 5,3 | 5,1 | 5,5 | 5,1 | 5,1 |
| 12 | 5,3 | 5,4 | 5,1 | 5,1 | 5,1 |
| 13 | 5,4 | 5,7 | 6,0 | 5,6 | 6,1 |
| 14 | 7,1 | 6,2 | 6,6 | 6,6 | 6,4 |
| 15 | 5,8 | 5,4 | 6,0 | 5,5 | 5,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,06 ± 0,75 | 6,07 ± 0,74 | 6,20 ± 0,73 | 5,95 ± 0,68 | 5,97 ± 0,63 |

| | Teilstudie III: Leukozyten [Gpt/l] | | | | |
|--------------------------------|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 3,5 | 3,9 | 7,3 | 6,5 | 3,3 |
| 2 | 5,8 | 6,3 | 10,0 | 9,7 | 6,3 |
| 3 | 4,0 | 4,3 | 7,1 | 9,9 | 4,3 |
| 4 | 3,9 | 4,7 | 8,7 | 9,5 | 3,8 |
| 5 | 4,9 | 5,0 | 8,0 | 8,1 | 4,6 |
| 6 | 4,5 | 5,0 | 8,5 | 8,4 | 4,0 |
| 7 | 4,2 | 4,7 | 8,5 | 7,4 | 4,4 |
| 8 | 5,1 | 5,6 | 7,8 | 6,5 | 5,5 |
| 9 | 4,5 | 5,7 | 8,2 | 7,1 | 4,8 |
| 10 | 3,6 | 4,3 | 7,7 | 6,9 | 3,8 |
| 11 | 4,4 | 4,7 | 8,6 | 8,8 | 5,1 |
| 12 | 3,7 | 4,4 | 7,1 | 5,1 | 3,4 |
| 13 | 4,1 | 4,8 | 8,3 | 6,5 | 3,6 |
| 14 | 5,2 | 5,7 | 11,1 | 11,7 | 4,9 |
| 15 | 4,7 | 5,8 | 11,4 | 9,3 | 4,9 |
| Mittelwert ± StAbw. | 4,6 ± 0,6 | 5,0 ± 0,7 | 8,0 ± 1,2 | 7,9 ± 1,6 | 4,4 ± 0,8 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 3,7 | 4,1 | 4,3 | 3,3 | 3,3 |
| 2 | 6,4 | 6,7 | 7,2 | 6,2 | 6,5 |
| 3 | 3,9 | 4,3 | 4,9 | 3,8 | 3,8 |
| 4 | 3,9 | 4,4 | 4,5 | 3,7 | 3,9 |
| 5 | 4,6 | 4,8 | 5,0 | 4,4 | 4,5 |
| 6 | 4,2 | 4,8 | 5,5 | 4,1 | 3,9 |
| 7 | 4,3 | 4,5 | 5,3 | 4,5 | 4,6 |
| 8 | 5,4 | 5,5 | 6,1 | 5,0 | 5,1 |
| 9 | 4,1 | 4,6 | 5,1 | 3,9 | 4,2 |
| 10 | 3,3 | 3,8 | 4,2 | 3,1 | 3,0 |
| 11 | 3,8 | 3,8 | 4,5 | 3,7 | 3,9 |
| 12 | 3,4 | 3,6 | 4,3 | 3,4 | 3,4 |
| 13 | 4,3 | 4,5 | 4,9 | 4,1 | 3,9 |
| 14 | 4,0 | 4,4 | 4,6 | 3,9 | 3,9 |
| 15 | 5,1 | 6,0 | 6,5 | 4,8 | 5,0 |
| Mittelwert ± StAbw. | 4,4 ± 0,8 | 4,7 ± 0,8 | 5,1 ± 0,8 | 4,2 ± 0,8 | 4,2 ± 0,9 |

| | Teilstudie III: Granulozyten [Gpt/l] | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 1,6 | 1,8 | 2,3 | 2,6 | 1,7 |
| 2 | 4,0 | 4,4 | 5,3 | 5,7 | 4,7 |
| 3 | 2,0 | 2,3 | 2,9 | 3,8 | 2,7 |
| 4 | 2,4 | 2,7 | 3,5 | 4,6 | 2,4 |
| 5 | 2,6 | 2,8 | 3,5 | 3,9 | 3,1 |
| 6 | 2,7 | 3,0 | 3,9 | 4,1 | 2,7 |
| 7 | 2,8 | 3,2 | 4,4 | 4,1 | 3,1 |
| 8 | 3,2 | 3,6 | 4,2 | 3,8 | 4,3 |
| 9 | 2,4 | 3,0 | 3,6 | 3,6 | 2,9 |
| 10 | 1,8 | 2,0 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| 11 | 2,6 | 2,7 | 3,5 | 3,8 | 3,3 |
| 12 | 2,3 | 2,6 | 3,0 | 2,7 | 2,1 |
| 13 | 1,8 | 2,1 | 2,7 | 2,6 | 1,9 |
| 14 | 2,9 | 3,2 | 4,3 | 4,9 | 3,3 |
| 15 | 2,6 | 3,1 | 4,5 | 4,2 | 3,2 |
| Mittelwert ± StAbw. | 2,6 ± 0,6 | 2,8 ± 0,7 | 3,4 ± 0,8 | 3,7 ± 0,9 | 2,9 ± 0,8 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 1,4 | 1,6 | 1,7 | 1,4 | 1,5 |
| 2 | 4,6 | 4,7 | 5,0 | 4,3 | 4,6 |
| 3 | 2,1 | 2,4 | 2,5 | 2,2 | 2,2 |
| 4 | 2,3 | 2,6 | 2,7 | 2,2 | 2,4 |
| 5 | 2,7 | 2,8 | 2,8 | 2,6 | 2,6 |
| 6 | 2,3 | 2,7 | 2,8 | 2,4 | 2,4 |
| 7 | 2,6 | 2,8 | 3,3 | 2,8 | 2,8 |
| 8 | 3,9 | 3,9 | 4,1 | 3,4 | 3,2 |
| 9 | 1,9 | 2,2 | 2,4 | 2,0 | 2,2 |
| 10 | 1,6 | 1,7 | 1,9 | 1,5 | 1,7 |
| 11 | 2,1 | 2,1 | 2,4 | 2,0 | 2,0 |
| 12 | 2,0 | 2,0 | 2,5 | 2,0 | 1,8 |
| 13 | 1,9 | 1,8 | 2,2 | 1,9 | 1,8 |
| 14 | 2,1 | 2,4 | 2,5 | 2,2 | 2,3 |
| 15 | 2,9 | 3,3 | 3,6 | 2,9 | 3,0 |
| Mittelwert ± StAbw. | 2,5 ± 0,8 | 2,7 ± 0,8 | 2,8 ± 0,9 | 2,4 ± 0,7 | 2,4 ± 0,8 |

| | Teilstudie III: Monozyten [Gpt/l] | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 0,2 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | 0,2 |
| 2 | 0,4 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,4 |
| 3 | 0,4 | 0,4 | 0,8 | 1,1 | 0,3 |
| 4 | 0,4 | 0,5 | 1,0 | 1,1 | 0,4 |
| 5 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,3 |
| 6 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,7 | 0,3 |
| 7 | 0,2 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | 0,1 |
| 8 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 |
| 9 | 0,3 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 0,3 |
| 10 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,3 |
| 11 | 0,4 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,4 |
| 12 | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,2 |
| 13 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,6 | 0,3 |
| 14 | 0,5 | 0,5 | 1,1 | 1,0 | 0,4 |
| 15 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,9 | 0,4 |
| Mittelwert ± StAbw. | 0,3 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 | 0,6 ± 0,2 | 0,7 ± 0,3 | 0,3 ± 0,1 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,2 |
| 2 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,5 |
| 3 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,3 |
| 4 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,4 |
| 5 | 0,2 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,3 |
| 6 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 0,3 |
| 7 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 8 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| 9 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 |
| 10 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| 11 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| 12 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |
| 13 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,4 |
| 14 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,3 |
| 15 | 0,5 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,3 |
| Mittelwert ± StAbw. | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,4 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 |

| | Teilstudie III: Lymphozyten [Gpt/l] | | | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 1,7 | 1,9 | 4,4 | 3,4 | 1,4 |
| 2 | 1,4 | 1,4 | 4,0 | 3,3 | 1,2 |
| 3 | 1,6 | 1,6 | 3,4 | 5,0 | 1,3 |
| 4 | 1,2 | 1,5 | 4,2 | 3,9 | 1,0 |
| 5 | 2,0 | 1,9 | 3,8 | 3,5 | 1,3 |
| 6 | 1,4 | 1,6 | 4,1 | 3,6 | 1,0 |
| 7 | 1,1 | 1,3 | 3,6 | 2,9 | 1,2 |
| 8 | 1,7 | 1,7 | 3,2 | 2,4 | 1,0 |
| 9 | 1,8 | 2,3 | 3,9 | 3,0 | 1,6 |
| 10 | 1,6 | 2,0 | 4,8 | 3,9 | 1,0 |
| 11 | 1,4 | 1,5 | 4,4 | 4,3 | 1,4 |
| 12 | 1,2 | 1,5 | 3,6 | 2,1 | 1,1 |
| 13 | 1,8 | 2,2 | 4,8 | 3,2 | 1,4 |
| 14 | 1,8 | 2,0 | 5,7 | 5,8 | 1,2 |
| 15 | 1,6 | 2,1 | 5,9 | 4,3 | 1,2 |
| Mittelwert ± StAbw. | 1,7 ± 0,3 | 1,8 ± 0,3 | 4,0 ± 0,8 | 3,5 ± 1,0 | 1,2 ± 0,2 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 2,0 | 2,2 | 2,3 | 1,6 | 1,5 |
| 2 | 1,4 | 1,5 | 1,7 | 1,5 | 1,5 |
| 3 | 1,5 | 1,5 | 1,9 | 1,3 | 1,2 |
| 4 | 1,1 | 1,3 | 1,3 | 1,0 | 1,1 |
| 5 | 1,6 | 1,5 | 1,8 | 1,5 | 1,6 |
| 6 | 1,5 | 1,7 | 2,2 | 1,2 | 1,2 |
| 7 | 1,4 | 1,5 | 1,8 | 1,5 | 1,6 |
| 8 | 1,3 | 1,5 | 1,7 | 1,4 | 1,7 |
| 9 | 1,8 | 2,1 | 2,2 | 1,6 | 1,7 |
| 10 | 1,4 | 1,9 | 2,0 | 1,4 | 1,2 |
| 11 | 1,5 | 1,5 | 1,8 | 1,6 | 1,7 |
| 12 | 1,1 | 1,3 | 1,5 | 1,2 | 1,4 |
| 13 | 2,0 | 2,2 | 2,2 | 1,7 | 1,8 |
| 14 | 1,5 | 1,6 | 1,6 | 1,3 | 1,2 |
| 15 | 1,8 | 2,3 | 2,4 | 1,6 | 1,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 1,6 ± 0,3 | 1,7 ± 0,3 | 1,9 ± 0,3 | 1,5 ± 0,2 | 1,5 ± 0,2 |

| | Teilstudie III: Thrombozytenaktivität % CD62P positive Zellen [%] | | | | |
|--------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 2,3 | 2,1 | 1,5 | 2,2 | 1,8 |
| 2 | 1,5 | 1,4 | 2,5 | 1,5 | 2,5 |
| 3 | 2,9 | 2,4 | 2,6 | 3,5 | 1,4 |
| 4 | 2,6 | 1,4 | 1,7 | 1,9 | 1,3 |
| 5 | 2,0 | 2,0 | 2,5 | 2,5 | 2,9 |
| 6 | 1,7 | 1,3 | 1,5 | 1,4 | 1,4 |
| 7 | 1,6 | 1,9 | 1,7 | 2,0 | 2,8 |
| 8 | 1,9 | 2,9 | 1,9 | 3,1 | 2,5 |
| 9 | 1,5 | 1,3 | 1,8 | 1,2 | 1,2 |
| 10 | 2,3 | 1,7 | 1,2 | 2,3 | 1,4 |
| 11 | 1,1 | 2,9 | 2,1 | 2,4 | 2,6 |
| 12 | 1,2 | 1,3 | 0,9 | 0,1 | 1,5 |
| 13 | 1,5 | 0,7 | 2,0 | 2,3 | 2,0 |
| 14 | 0,9 | 1,2 | 1,4 | 1,1 | 1,4 |
| 15 | 3,0 | 1,9 | 1,7 | 2,4 | 1,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 1,9 ± 0,6 | 1,8 ± 0,6 | 1,8 ± 0,5 | 2,0 ± 0,8 | 1,9 ± 0,6 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 2,4 | 1,6 | 2,7 | 2,3 | 3,2 |
| 2 | 2,3 | 2,4 | 3,3 | 2,9 | 1,6 |
| 3 | 2,4 | 2,9 | 2,2 | 1,1 | 2,4 |
| 4 | 3,6 | 2,8 | 2,2 | 2,5 | 3,0 |
| 5 | 2,1 | 1,9 | 2,2 | 2,1 | 1,9 |
| 6 | 2,1 | 2,4 | 2,4 | 2,4 | 2,7 |
| 7 | 1,4 | 1,5 | 1,8 | 2,1 | 1,5 |
| 8 | 2,1 | 2,3 | 2,5 | 1,8 | 2,1 |
| 9 | 1,3 | 1,2 | 1,8 | 2,1 | 1,0 |
| 10 | 1,8 | 1,8 | 1,5 | 2,1 | 1,8 |
| 11 | 1,1 | 1,2 | 2,3 | 2,8 | 2,2 |
| 12 | 2,8 | 1,4 | 2,3 | 1,7 | 2,1 |
| 13 | 1,6 | 1,2 | 1,4 | 2,2 | 2,1 |
| 14 | 1,3 | 1,4 | 1,8 | 1,8 | 1,8 |
| 15 | 0,9 | 1,0 | 1,1 | 1,9 | 1,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 1,9 ± 0,7 | 1,8 ± 0,6 | 2,1 ± 0,6 | 2,1 ± 0,4 | 2,1 ± 0,6 |

| | Teilstudie III: Thrombozytenaktivität mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE [dimensionslos] | | | | |
|-------------------|---|----------------|------------------|---------------|---------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 11,5 | 13,4 | 12,4 | 12,0 | 10,7 |
| 2 | 11,9 | 13,1 | 11,2 | 14,8 | 14,1 |
| 3 | 13,1 | 10,4 | 10,7 | 12,0 | 11,6 |
| 4 | 10,2 | 9,6 | 9,2 | 10,5 | 10,5 |
| 5 | 10,1 | 11,9 | 12,5 | 11,5 | 12,1 |
| 6 | 11,4 | 10,8 | 11,5 | 11,6 | 10,7 |
| 7 | 10,6 | 10,0 | 10,3 | 10,7 | 12,4 |
| 8 | 11,2 | 11,0 | 12,9 | 10,8 | 10,6 |
| 9 | 10,6 | 9,7 | 10,2 | 10,9 | 10,8 |
| 10 | 12,0 | 10,3 | 10,6 | 13,1 | 10,7 |
| 11 | 9,5 | 8,0 | 10,9 | 10,3 | 15,7 |
| 12 | 13,9 | 10,5 | 14,5 | 13,2 | 13,8 |
| 13 | 16,2 | 15,4 | 14,2 | 14,6 | 12,2 |
| 14 | 11,7 | 11,3 | 11,1 | 10,7 | 9,7 |
| 15 | 14,0 | 12,3 | 13,3 | 11,2 | 12,3 |
| Mittelwert | 11,9 | 11,2 | 11,7 | 11,9 | 11,9 |
| ± StAbw. | ± 1,8 | ± 1,8 | ± 1,5 | ± 1,4 | ± 1,6 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 12,7 | 12,0 | 10,9 | 13,5 | 13,0 |
| 2 | 11,5 | 11,0 | 11,6 | 12,0 | 12,5 |
| 3 | 11,4 | 12,5 | 11,8 | 11,3 | 12,0 |
| 4 | 11,6 | 9,9 | 12,5 | 11,9 | 12,5 |
| 5 | 11,4 | 12,3 | 12,8 | 11,5 | 13,4 |
| 6 | 12,2 | 12,6 | 14,1 | 12,6 | 11,1 |
| 7 | 10,8 | 10,9 | 10,8 | 10,8 | 11,5 |
| 8 | 9,9 | 11,1 | 11,3 | 10,8 | 11,0 |
| 9 | 11,1 | 9,6 | 9,9 | 10,4 | 10,6 |
| 10 | 9,1 | 10,9 | 10,2 | 10,0 | 11,2 |
| 11 | 9,0 | 10,7 | 10,0 | 10,1 | 10,6 |
| 12 | 14,8 | 14,0 | 14,4 | 13,0 | 13,7 |
| 13 | 15,0 | 17,0 | 15,6 | 20,9 | 14,4 |
| 14 | 10,5 | 10,1 | 10,0 | 9,5 | 9,6 |
| 15 | 12,7 | 13,0 | 11,6 | 12,2 | 12,6 |
| Mittelwert | 11,6 | 11,8 | 11,8 | 12,0 | 12,0 |
| ± StAbw. | ± 1,7 | ± 1,9 | ± 1,7 | ± 2,7 | ± 1,3 |

| | Teilstudie III: Thrombozytenaktivität % CD63 positive Zellen [%] | | | | |
|--------------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 3,7 | 4,2 | 3,5 | 4,0 | 2,1 |
| 2 | 5,6 | 4,6 | 6,4 | 4,4 | 2,9 |
| 3 | 4,2 | 3,7 | 3,8 | 4,1 | 4,2 |
| 4 | 3,8 | 3,1 | 4,1 | 5,4 | 3,5 |
| 5 | 5,3 | 4,8 | 5,1 | 5,1 | 2,8 |
| 6 | 3,5 | 3,3 | 5,5 | 4,6 | 5,6 |
| 7 | 1,3 | 1,0 | 1,6 | 1,7 | 2,0 |
| 8 | 5,1 | 5,6 | 5,0 | 5,7 | 4,6 |
| 9 | 2,5 | 2,4 | 3,5 | 2,9 | 3,0 |
| 10 | 4,4 | 2,2 | 4,0 | 3,5 | 1,9 |
| 11 | 6,2 | 8,6 | 7,5 | 6,9 | 5,1 |
| 12 | 4,2 | 3,7 | 5,8 | 3,2 | 4,7 |
| 13 | 3,7 | 2,0 | 4,8 | 3,9 | 3,5 |
| 14 | 3,4 | 5,9 | 3,6 | 4,6 | 4,5 |
| 15 | 9,6 | 8,7 | 10,2 | 7,5 | 9,4 |
| Mittelwert ± StAbw. | 4,4 ± 1,9 | 4,3 ± 2,2 | 4,9 ± 2,0 | 4,5 ± 1,5 | 4,0 ± 1,9 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 3,9 | 5,4 | 5,2 | 4,9 | 5,5 |
| 2 | 5,9 | 5,4 | 5,4 | 5,5 | 5,7 |
| 3 | 3,3 | 3,6 | 4,8 | 1,5 | 2,8 |
| 4 | 7,0 | 4,3 | 6,6 | 3,4 | 4,5 |
| 5 | 3,9 | 4,0 | 4,8 | 4,5 | 3,6 |
| 6 | 7,9 | 6,4 | 4,8 | 6,2 | 6,2 |
| 7 | 2,0 | 2,0 | 2,7 | 2,3 | 2,3 |
| 8 | 6,0 | 4,2 | 5,8 | 4,9 | 4,9 |
| 9 | 3,2 | 2,6 | 2,3 | 2,7 | 2,4 |
| 10 | 2,8 | 2,4 | 2,7 | 3,0 | 2,9 |
| 11 | 5,6 | 4,1 | 5,4 | 5,9 | 5,4 |
| 12 | 6,7 | 6,8 | 6,6 | 7,2 | 6,4 |
| 13 | 3,7 | 3,0 | 3,0 | 4,5 | 3,3 |
| 14 | 6,6 | 5,7 | 4,7 | 5,4 | 5,1 |
| 15 | 5,9 | 5,3 | 6,7 | 6,0 | 7,0 |
| Mittelwert ± StAbw. | 4,9 ± 1,8 | 4,3 ± 1,5 | 4,8 ± 1,5 | 4,5 ± 1,6 | 4,5 ± 1,6 |

| | Teilstudie III: Thrombozytenreaktivität nach Stimulation mit 7,5 µM TRAP-6 % CD62P positive Zellen [%] | | | | |
|--------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 46,6 | 57,0 | 71,4 | 62,3 | 64,6 |
| 2 | 56,6 | 37,0 | 51,5 | 57,3 | 29,6 |
| 3 | 30,7 | 43,0 | 47,5 | 50,6 | 40,8 |
| 4 | 51,2 | 48,8 | 55,2 | 68,4 | 58,4 |
| 5 | 46,7 | 50,8 | 77,6 | 57,3 | 52,2 |
| 6 | 28,3 | 28,1 | 44,8 | 41,1 | 36,3 |
| 7 | 38,9 | 45,1 | 58,2 | 54,9 | 64,5 |
| 8 | | | | | |
| 9 | 41,6 | 29,1 | 37,6 | 37,8 | 34,9 |
| 10 | 21,7 | 30,8 | 40,3 | 42,8 | 26,6 |
| 11 | 48,0 | 43,5 | 53,6 | 65,5 | 58,7 |
| 12 | 41,5 | 33,7 | 40,5 | 44,3 | 45,4 |
| 13 | 29,8 | 31,5 | 51,4 | 51,1 | 20,3 |
| 14 | 37,9 | 53,0 | 44,3 | 54,1 | 38,3 |
| 15 | 22,1 | 36,5 | 36,9 | 35,6 | 44,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 38,7 ± 10,8 | 40,6 ± 9,5 | 50,8 ± 12,1 | 51,7 ± 10,2 | 43,9 ± 14,1 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 29,0 | 29,1 | 37,6 | 26,1 | 26,2 |
| 2 | 47,3 | 40,7 | 49,4 | 44,9 | 57,9 |
| 3 | 48,1 | 29,2 | 56,6 | 38,7 | 44,3 |
| 4 | 54,2 | 45,0 | 62,3 | 48,9 | 47,4 |
| 5 | 38,0 | 51,4 | 52,3 | 53,9 | 46,0 |
| 6 | 29,1 | 41,3 | 38,9 | 37,1 | 27,3 |
| 7 | 61,7 | 62,5 | 58,4 | 60,7 | 67,8 |
| 8 | 54,6 | 64,8 | 55,5 | 47,5 | 55,1 |
| 9 | 34,5 | 32,1 | 35,8 | 34,5 | 40,5 |
| 10 | 27,3 | 28,1 | 32,9 | 33,0 | 28,5 |
| 11 | 51,2 | 39,7 | 38,3 | 42,3 | 50,8 |
| 12 | 37,6 | 48,9 | 53,6 | 43,0 | 51,5 |
| 13 | 23,6 | 30,7 | 26,5 | 39,7 | 31,4 |
| 14 | 52,6 | 38,4 | 37,1 | 41,7 | 41,3 |
| 15 | 51,5 | 42,0 | 51,0 | 44,8 | 48,7 |
| Mittelwert ± StAbw. | 42,7 ± 12,0 | 41,6 ± 11,5 | 45,7 ± 10,9 | 42,4 ± 8,5 | 44,3 ± 12,1 |

| | Teilstudie III: Thrombozytenaktivität nach Stimulation mit 7,5 µM TRAP-6 mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE [dimensionslos] | | | | |
|-------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 18,9 | 19,9 | 22,9 | 21,0 | 21,7 |
| 2 | 17,6 | 17,7 | 19,2 | 21,5 | 17,5 |
| 3 | 16,7 | 17,2 | 19,2 | 20,8 | 19,8 |
| 4 | 15,7 | 15,4 | 18,5 | 20,6 | 19,5 |
| 5 | 15,0 | 15,7 | 25,9 | 16,8 | 15,7 |
| 6 | 14,4 | 16,7 | 20,6 | 17,2 | 16,4 |
| 7 | 16,9 | 16,4 | 19,7 | 19,3 | 19,2 |
| 8 | | | | | |
| 9 | 21,3 | 14,8 | 21,0 | 15,8 | 17,9 |
| 10 | 11,0 | 13,3 | 14,2 | 13,2 | 12,2 |
| 11 | 15,1 | 14,1 | 15,4 | 16,2 | 18,6 |
| 12 | 17,4 | 16,9 | 18,3 | 14,6 | 16,0 |
| 13 | 19,0 | 16,8 | 21,9 | 16,8 | 18,4 |
| 14 | 15,9 | 18,9 | 17,8 | 18,3 | 16,1 |
| 15 | 16,2 | 16,5 | 19,8 | 18,8 | 18,5 |
| Mittelwert | 16,5 | 16,5 | 19,6 | 17,9 | 17,7 |
| ± StAbw. | ± 2,4 | ± 1,8 | ± 2,9 | ± 2,5 | ± 2,3 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 16,8 | 17,0 | 18,0 | 15,0 | 16,3 |
| 2 | 17,0 | 17,5 | 20,0 | 16,3 | 18,6 |
| 3 | 15,2 | 15,6 | 16,4 | 20,1 | 16,3 |
| 4 | 20,7 | 17,2 | 18,7 | 19,3 | 17,5 |
| 5 | 15,7 | 17,1 | 17,4 | 16,4 | 14,8 |
| 6 | 16,5 | 20,1 | 17,3 | 16,4 | 17,6 |
| 7 | 18,7 | 18,4 | 16,1 | 18,3 | 18,2 |
| 8 | 20,7 | 23,1 | 21,1 | 17,9 | 19,9 |
| 9 | 16,4 | 15,0 | 13,6 | 15,4 | 15,4 |
| 10 | 12,3 | 12,4 | 14,2 | 14,0 | 12,4 |
| 11 | 15,6 | 14,9 | 13,7 | 13,8 | 16,9 |
| 12 | 14,9 | 19,1 | 19,3 | 19,1 | 17,4 |
| 13 | 15,3 | 15,7 | 17,2 | 14,1 | 17,4 |
| 14 | 18,7 | 18,2 | 16,1 | 16,2 | 17,8 |
| 15 | 18,4 | 17,8 | 15,4 | 17,8 | 19,1 |
| Mittelwert | 16,9 | 17,3 | 17,0 | 16,7 | 17,0 |
| ± StAbw. | ± 2,3 | ± 2,5 | ± 2,2 | ± 2,0 | ± 1,9 |

| | Teilstudie III: Granulozyten-Thrombozyten Konjugate in % | | | | |
|--------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 8,9 | 9,2 | 13,3 | 13,2 | 9,8 |
| 2 | 12,7 | 9,4 | 21,8 | 15,3 | 18,6 |
| 3 | 8,4 | 9,2 | 24,7 | 21,2 | 11,6 |
| 4 | 8,4 | 8,7 | 24,9 | 23,5 | 7,1 |
| 5 | 12,5 | 8,3 | 24,2 | 21,9 | 10,7 |
| 6 | 11,6 | 7,9 | 13,6 | 11,6 | 13,5 |
| 7 | 11,8 | 11,4 | 19,7 | 17,1 | 16,7 |
| 8 | 15,8 | 15,1 | 18,0 | 21,2 | 12,6 |
| 9 | 14,7 | 11,8 | 24,4 | 14,4 | 7,5 |
| 10 | 7,3 | 11,8 | 13,3 | 11,2 | 15,7 |
| 11 | 9,8 | 29,7 | 27,9 | 18,9 | 12,5 |
| 12 | 8,4 | 10,7 | 15,5 | 12,8 | 15,6 |
| 13 | 24,0 | 17,4 | 19,0 | 18,3 | 19,6 |
| 14 | 6,7 | 9,7 | 8,5 | 12,9 | 7,0 |
| 15 | 16,6 | 12,2 | 36,2 | 22,2 | 18,3 |
| Mittelwert ± StAbw. | 11,8 ± 4,5 | 12,2 ± 5,5 | 20,3 ± 7,1 | 17,0 ± 4,3 | 13,1 ± 4,2 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 17,2 | 12,9 | 25,0 | 10,6 | 9,7 |
| 2 | 14,8 | 14,3 | 17,4 | 10,4 | 7,2 |
| 3 | 6,5 | 7,6 | 6,3 | 9,7 | 7,7 |
| 4 | 10,3 | 6,9 | 7,9 | 9,1 | 7,1 |
| 5 | 17,8 | 18,5 | 11,8 | 11,9 | 9,5 |
| 6 | 6,8 | 8,1 | 5,8 | 7,2 | 6,2 |
| 7 | 12,2 | 14,7 | 22,3 | 15,4 | 11,9 |
| 8 | 20,2 | 16,3 | 19,4 | 12,1 | 17,2 |
| 9 | 9,6 | 9,7 | 8,8 | 12,1 | 8,2 |
| 10 | 15,4 | 15,7 | 18,2 | 16,9 | 10,1 |
| 11 | 8,8 | 7,3 | 15,8 | 9,7 | 9,2 |
| 12 | 15,0 | 12,3 | 16,7 | 10,4 | 13,9 |
| 13 | 7,7 | 9,2 | 7,8 | 9,7 | 8,8 |
| 14 | 10,7 | 10,1 | 16,7 | 9,4 | 14,5 |
| 15 | 13,4 | 10,0 | 12,3 | 11,5 | 11,6 |
| Mittelwert ± StAbw. | 12,4 ± 4,2 | 11,6 ± 3,7 | 14,2 ± 6,0 | 11,1 ± 2,5 | 10,2 ± 3,1 |

| | Teilstudie III: Monozyten-Thrombozyten Konjugate in % | | | | |
|--------------------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 13,1 | 8,1 | 21,1 | 22,2 | 16,4 |
| 2 | 15,2 | 9,1 | 38,4 | 27,8 | 35,6 |
| 3 | 12,1 | 10,7 | 48,6 | 35,7 | 17,0 |
| 4 | 7,2 | 11,4 | 48,8 | 56,1 | 5,7 |
| 5 | 21,3 | 10,8 | 48,9 | 36,8 | 12,2 |
| 6 | 22,4 | 12,1 | 24,1 | 21,4 | 18,8 |
| 7 | 16,4 | 15,3 | 39,0 | 36,9 | 33,5 |
| 8 | 28,9 | 24,2 | 28,9 | 38,1 | 21,3 |
| 9 | 16,6 | 27,5 | 52,2 | 19,1 | 8,4 |
| 10 | 7,4 | 16,6 | 20,5 | 22,2 | 28,2 |
| 11 | 14,1 | 56,1 | 59,5 | 33,5 | 22,9 |
| 12 | 12,1 | 13,1 | 27,4 | 16,5 | 21,3 |
| 13 | 41,4 | 30,1 | 29,1 | 30,0 | 30,4 |
| 14 | 6,3 | 13,7 | 16,3 | 22,7 | 10,9 |
| 15 | 18,0 | 17,3 | 63,6 | 31,7 | 31,9 |
| Mittelwert ± StAbw. | 16,8 ± 9,1 | 18,4 ± 12,4 | 37,8 ± 15,1 | 30,0 ± 10,2 | 21,0 ± 9,4 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 25,9 | 18,1 | 41,1 | 17,6 | 14,2 |
| 2 | 34,7 | 29,6 | 32,3 | 13,3 | 7,0 |
| 3 | 6,4 | 10,2 | 7,9 | 15,6 | 7,9 |
| 4 | 13,9 | 6,1 | 6,3 | 9,3 | 9,6 |
| 5 | 28,4 | 29,2 | 15,3 | 16,8 | 18,3 |
| 6 | 9,0 | 15,2 | 10,1 | 11,2 | 11,8 |
| 7 | 17,6 | 20,9 | 46,8 | 24,8 | 17,5 |
| 8 | 54,5 | 29,7 | 33,1 | 18,3 | 29,2 |
| 9 | 13,5 | 13,9 | 17,1 | 26,4 | 14,9 |
| 10 | 30,8 | 23,7 | 35,9 | 27,4 | 15,5 |
| 11 | 11,4 | 7,4 | 28,1 | 11,0 | 8,5 |
| 12 | 19,7 | 14,2 | 22,0 | 15,3 | 23,8 |
| 13 | 7,3 | 9,2 | 8,3 | 12,3 | 10,9 |
| 14 | 21,6 | 15,5 | 36,4 | 17,8 | 27,4 |
| 15 | 14,1 | 17,7 | 15,8 | 13,9 | 17,5 |
| Mittelwert ± StAbw. | 20,6 ± 12,8 | 17,4 ± 7,9 | 23,8 ± 13,3 | 16,7 ± 5,6 | 15,6 ± 6,9 |

| | Teilstudie III: Lymphozyten-Thrombozyten Konjugate in % | | | | |
|--------------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 4,6 | 4,6 | 5,2 | 6,1 | 4,1 |
| 2 | 8,3 | 6,2 | 11,0 | 10,0 | 8,1 |
| 3 | 7,0 | 7,1 | 13,3 | 12,8 | 8,8 |
| 4 | 5,8 | 7,0 | 10,6 | 16,1 | 5,2 |
| 5 | 8,4 | 5,6 | 12,2 | 11,2 | 7,9 |
| 6 | 5,1 | 4,4 | 7,0 | 5,8 | 5,3 |
| 7 | 5,5 | 5,7 | 8,2 | 8,3 | 6,3 |
| 8 | 5,3 | 5,7 | 7,3 | 6,5 | 4,4 |
| 9 | 5,9 | 6,3 | 9,5 | 6,8 | 4,2 |
| 10 | 4,4 | 7,5 | 8,9 | 7,8 | 8,5 |
| 11 | 6,7 | 7,9 | 11,0 | 10,6 | 8,4 |
| 12 | 4,5 | 6,2 | 7,5 | 6,6 | 7,1 |
| 13 | 9,0 | 7,5 | 8,8 | 9,1 | 8,7 |
| 14 | 4,1 | 6,7 | 6,4 | 10,1 | 4,6 |
| 15 | 8,3 | 6,4 | 12,1 | 9,7 | 6,3 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,2 ± 1,7 | 6,3 ± 1,0 | 9,3 ± 2,4 | 9,2 ± 2,8 | 6,5 ± 1,8 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 4,6 | 4,5 | 6,5 | 3,8 | 4,2 |
| 2 | 7,4 | 6,6 | 7,5 | 6,1 | 5,2 |
| 3 | 5,9 | 7,3 | 6,3 | 7,4 | 7,1 |
| 4 | 6,9 | 5,9 | 5,5 | 6,2 | 4,9 |
| 5 | 8,4 | 10,5 | 8,5 | 7,9 | 6,2 |
| 6 | 2,9 | 4,8 | 3,2 | 4,6 | 2,8 |
| 7 | 6,0 | 6,9 | 9,6 | 7,1 | 6,4 |
| 8 | 5,9 | 5,9 | 6,3 | 4,8 | 6,0 |
| 9 | 5,4 | 5,3 | 4,9 | 6,9 | 5,0 |
| 10 | 7,4 | 8,3 | 9,5 | 9,4 | 7,1 |
| 11 | 6,2 | 6,1 | 7,6 | 7,6 | 6,6 |
| 12 | 5,1 | 5,7 | 7,8 | 5,0 | 5,2 |
| 13 | 5,1 | 5,0 | 5,4 | 5,6 | 5,9 |
| 14 | 5,6 | 5,9 | 7,5 | 6,5 | 7,8 |
| 15 | 6,7 | 6,4 | 7,4 | 6,6 | 6,9 |
| Mittelwert ± StAbw. | 6,0 ± 1,3 | 6,3 ± 1,5 | 6,9 ± 1,7 | 6,4 ± 1,5 | 5,8 ± 1,3 |

| | Teilstudie III: Granulozyten-Thrombozyten Konjugate MFI mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE [dimensionslos] | | | | |
|-------------------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 0,45 | 0,44 | 0,58 | 0,60 | 0,45 |
| 2 | 0,48 | 0,39 | 0,87 | 0,63 | 0,79 |
| 3 | 0,39 | 0,41 | 1,08 | 0,86 | 0,48 |
| 4 | 0,35 | 0,35 | 0,99 | 1,01 | 0,35 |
| 5 | 0,53 | 0,33 | 1,02 | 0,83 | 0,42 |
| 6 | 0,49 | 0,39 | 0,58 | 0,51 | 0,61 |
| 7 | 0,44 | 0,46 | 0,76 | 0,66 | 0,64 |
| 8 | 0,66 | 0,65 | 0,76 | 0,97 | 0,56 |
| 9 | 0,65 | 0,52 | 1,03 | 0,64 | 0,41 |
| 10 | 0,36 | 0,49 | 0,53 | 0,51 | 0,66 |
| 11 | 0,41 | 1,04 | 1,05 | 0,70 | 0,54 |
| 12 | 0,43 | 0,48 | 0,64 | 0,54 | 0,65 |
| 13 | 0,95 | 0,76 | 0,89 | 0,81 | 0,87 |
| 14 | 0,33 | 0,39 | 0,37 | 0,50 | 0,34 |
| 15 | 0,65 | 0,51 | 1,45 | 0,85 | 0,81 |
| Mittelwert | 0,50 | 0,51 | 0,84 | 0,71 | 0,57 |
| ± StAbw. | ± 0,15 | ± 0,19 | ± 0,28 | ± 0,17 | ± 0,17 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 0,82 | 0,59 | 1,08 | 0,52 | 0,45 |
| 2 | 0,64 | 0,60 | 0,71 | 0,45 | 0,34 |
| 3 | 0,32 | 0,35 | 0,31 | 0,44 | 0,35 |
| 4 | 0,45 | 0,38 | 0,36 | 0,42 | 0,36 |
| 5 | 0,74 | 0,71 | 0,44 | 0,48 | 0,45 |
| 6 | 0,36 | 0,44 | 0,35 | 0,38 | 0,36 |
| 7 | 0,48 | 0,55 | 0,82 | 0,59 | 0,48 |
| 8 | 0,89 | 0,72 | 0,81 | 0,54 | 0,70 |
| 9 | 0,47 | 0,41 | 0,44 | 0,54 | 0,41 |
| 10 | 0,61 | 0,61 | 0,72 | 0,66 | 0,44 |
| 11 | 0,35 | 0,32 | 0,60 | 0,37 | 0,38 |
| 12 | 0,63 | 0,59 | 0,66 | 0,48 | 0,58 |
| 13 | 0,44 | 0,49 | 0,42 | 0,46 | 0,42 |
| 14 | 0,45 | 0,48 | 0,70 | 0,39 | 0,58 |
| 15 | 0,56 | 0,44 | 0,50 | 0,49 | 0,48 |
| Mittelwert | 0,55 | 0,51 | 0,59 | 0,48 | 0,45 |
| ± StAbw. | ± 0,17 | ± 0,12 | ± 0,22 | ± 0,08 | ± 0,10 |

| | Teilstudie III: Monozyten-Thrombozyten Konjugate mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE [dimensionslos] | | | | |
|-------------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 2,08 | 1,85 | 2,58 | 2,63 | 2,05 |
| 2 | 1,92 | 1,67 | 4,12 | 2,94 | 4,68 |
| 3 | 1,73 | 1,82 | 4,51 | 3,65 | 2,06 |
| 4 | 1,68 | 1,62 | 5,00 | 5,29 | 1,79 |
| 5 | 3,01 | 1,85 | 5,98 | 3,93 | 2,07 |
| 6 | 2,30 | 1,77 | 2,58 | 2,32 | 2,19 |
| 7 | 1,95 | 1,96 | 3,53 | 3,83 | 3,79 |
| 8 | 3,05 | 2,41 | 3,26 | 4,93 | 2,73 |
| 9 | 2,54 | 3,21 | 5,65 | 2,38 | 1,82 |
| 10 | 1,60 | 1,94 | 2,30 | 2,74 | 3,38 |
| 11 | 2,08 | 4,90 | 5,61 | 3,20 | 2,73 |
| 12 | 1,86 | 1,84 | 2,56 | 2,04 | 2,73 |
| 13 | 3,85 | 3,48 | 3,33 | 3,05 | 3,45 |
| 14 | 1,67 | 1,78 | 2,27 | 2,18 | 1,73 |
| 15 | 2,58 | 2,26 | 5,88 | 3,41 | 4,11 |
| Mittelwert | 2,26 | 2,29 | 3,94 | 3,23 | 2,75 |
| ± StAbw. | ± 0,64 | ± 0,91 | ± 1,39 | ± 0,96 | ± 0,93 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 3,33 | 2,69 | 2,25 | 2,33 | 2,02 |
| 2 | 3,91 | 3,19 | 3,91 | 1,94 | 1,61 |
| 3 | 1,56 | 1,65 | 1,50 | 2,23 | 1,54 |
| 4 | 2,68 | 2,15 | 1,69 | 2,14 | 1,99 |
| 5 | 3,74 | 3,31 | 1,93 | 1,97 | 2,27 |
| 6 | 1,79 | 2,44 | 1,70 | 1,90 | 2,56 |
| 7 | 2,32 | 2,48 | 4,47 | 2,59 | 2,36 |
| 8 | 5,31 | 3,05 | 4,45 | 2,39 | 2,77 |
| 9 | 2,05 | 1,91 | 2,36 | 2,89 | 1,93 |
| 10 | 3,15 | 2,75 | 3,78 | 3,11 | 2,22 |
| 11 | 2,19 | 1,41 | 2,99 | 1,60 | 1,77 |
| 12 | 2,70 | 2,23 | 2,65 | 2,26 | 3,01 |
| 13 | 1,94 | 2,15 | 1,91 | 2,17 | 2,50 |
| 14 | 2,78 | 2,28 | 3,92 | 2,13 | 2,95 |
| 15 | 2,12 | 2,10 | 1,93 | 1,92 | 2,27 |
| Mittelwert | 2,77 | 2,39 | 2,76 | 2,24 | 2,25 |
| ± StAbw. | ± 0,99 | ± 0,54 | ± 1,07 | ± 0,39 | ± 0,45 |

| | Teilstudie III: Lymphozyten-Thrombozyten Konjugate mittlere Fluoreszenzintensität CD41-PE [dimensionslos] | | | | |
|-------------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Ruhe | Warm-Up | Belastung | 15 min | 60 min |
| Probanden | 90-Sekunden Test | | | | |
| 1 | 0,31 | 0,31 | 0,36 | 0,35 | 0,28 |
| 2 | 0,40 | 0,34 | 0,52 | 0,49 | 0,45 |
| 3 | 0,38 | 0,39 | 0,65 | 0,58 | 0,39 |
| 4 | 0,34 | 0,35 | 0,52 | 0,74 | 0,33 |
| 5 | 0,40 | 0,32 | 0,54 | 0,46 | 0,36 |
| 6 | 0,35 | 0,32 | 0,45 | 0,37 | 0,38 |
| 7 | 0,28 | 0,30 | 0,39 | 0,38 | 0,33 |
| 8 | 0,33 | 0,36 | 0,43 | 0,40 | 0,29 |
| 9 | 0,36 | 0,36 | 0,47 | 0,39 | 0,33 |
| 10 | 0,35 | 0,46 | 0,52 | 0,47 | 0,48 |
| 11 | 0,41 | 0,39 | 0,59 | 0,52 | 0,47 |
| 12 | 0,36 | 0,37 | 0,43 | 0,37 | 0,40 |
| 13 | 0,51 | 0,48 | 0,58 | 0,55 | 0,49 |
| 14 | 0,32 | 0,36 | 0,39 | 0,46 | 0,34 |
| 15 | 0,46 | 0,44 | 0,68 | 0,61 | 0,50 |
| Mittelwert | 0,37 | 0,37 | 0,50 | 0,47 | 0,39 |
| ± StAbw. | ± 0,06 | ± 0,05 | ± 0,10 | ± 0,11 | ± 0,07 |
| | Kontrolle | | | | |
| 1 | 0,35 | 0,35 | 0,43 | 0,34 | 0,32 |
| 2 | 0,40 | 0,36 | 0,41 | 0,34 | 0,32 |
| 3 | 0,35 | 0,39 | 0,36 | 0,42 | 0,36 |
| 4 | 0,42 | 0,38 | 0,38 | 0,40 | 0,35 |
| 5 | 0,41 | 0,42 | 0,37 | 0,37 | 0,35 |
| 6 | 0,34 | 0,40 | 0,38 | 0,36 | 0,36 |
| 7 | 0,31 | 0,34 | 0,39 | 0,36 | 0,33 |
| 8 | 0,38 | 0,39 | 0,38 | 0,33 | 0,35 |
| 9 | 0,34 | 0,31 | 0,33 | 0,35 | 0,31 |
| 10 | 0,39 | 0,42 | 0,45 | 0,45 | 0,37 |
| 11 | 0,30 | 0,31 | 0,34 | 0,33 | 0,31 |
| 12 | 0,34 | 0,39 | 0,41 | 0,36 | 0,35 |
| 13 | 0,39 | 0,40 | 0,39 | 0,39 | 0,38 |
| 14 | 0,36 | 0,39 | 0,39 | 0,37 | 0,39 |
| 15 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,37 | 0,37 |
| Mittelwert | 0,37 | 0,38 | 0,39 | 0,37 | 0,35 |
| ± StAbw. | ± 0,04 | ± 0,03 | ± 0,03 | ± 0,03 | ± 0,03 |

| Proband | Teilstudie III: Probenstabilität Konjugate | | | |
|---------------------------------------|--|--------|--------|--------|
| | 0 min | 15 min | 30 min | 60 min |
| % Granulozyten-Thrombozyten Konjugate | | | | |
| 1 | 16,0 | 18,8 | 20,9 | 22,8 |
| 2 | 12,1 | 16,1 | 18,3 | 23,9 |
| 3 | 17,4 | 18,1 | 22,6 | 26,0 |
| 4 | 17,2 | 21,8 | 25,1 | 28,1 |
| 5 | 18,2 | 22,9 | 23,8 | 28,1 |
| % Monozyten-Thrombozyten Konjugate | | | | |
| 1 | 26,2 | 26,2 | 29,4 | 33,8 |
| 2 | 19,4 | 26,6 | 35,0 | 37,0 |
| 3 | 25,4 | 30,2 | 32,6 | 40,0 |
| 4 | 26,4 | 28,0 | 29,8 | 37,5 |
| 5 | 25,8 | 32,2 | 38,2 | 42,2 |
| % Lymphozyten-Thrombozyten Konjugate | | | | |
| 1 | 5,7 | 8,3 | 8,9 | 8,2 |
| 2 | 7,4 | 6,9 | 7,4 | 7,9 |
| 3 | 7,8 | 9,3 | 8,5 | 9,4 |
| 4 | 6,5 | 8,4 | 10,9 | 10,8 |
| 5 | 8,7 | 9,0 | 9,4 | 10,7 |

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ebenso wurde die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Diese Promotionsschrift beruht auf den Ergebnissen von drei Interventionsstudien und entsprechender Vorversuche im Labor, welche mit Unterstützung der Arbeitsgruppe für vaskuläre Sportmedizin am Lehrstuhl für Sportmedizin durchgeführt wurden. Die Auswertung der gewonnenen Daten und die Auswahl der präsentierten Ergebnisse erfolgte selbständig. Das Manuskript wurde ohne Hilfestellung durch Dritte angefertigt. Darüber hinaus haben Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ebenso wurde weder die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung an einer anderen Hochschule oder anderen Fakultät als Dissertation eingereicht.

Hiermit versichere ich, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, den _____

Volker Schmidt

Danksagung

All denjenigen zu danken, welche mich auf dem Weg bis zur Fertigstellung der Dissertation begleitet haben, ist keine Pflichtübung sondern eine tiefe Angelegenheit des Herzens.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. H.H.W. Gabriel für die freundliche und menschliche Aufnahme am Lehrstuhl für Sportmedizin und die engagierte Unterstützung meines Promotionsvorhabens. Ihm verdanke ich wertvolle Erfahrungen im Umgang mit wissenschaftlichen Fragestellungen und der Planung von Studien. Danke auch für die Korrektur des Manuskriptes und die Begutachtung der Arbeit.

Ebenso dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. T. Hilberg. Als Leiter der Arbeitsgruppe für vaskuläre Sportmedizin war er der maßgebliche Betreuer dieser Arbeit. Ein großes Mass an gelassener Freiheit wie auch zahlreiche Gespräche zu methodischen und inhaltlichen Fragestellungen, welche bisweilen sehr intensiv aber immer gewinnbringend waren, haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Seine Begeisterung für die vaskuläre Sportmedizin und die ansteckende Motivation für die gemeinsamen Projekte waren auch für mich ein wichtiger Ansporn.

Die durchgeführten Belastungsuntersuchungen waren nur durch die gute Zusammenarbeit eines Teams möglich. Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für vaskuläre Sportmedizin und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Sportmedizin für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung im Labor sowie bei der Durchführung der Ergometrien. Stellvertretend für alle anderen geht ein besonderer Dank an Frau Dr. phil. D. Gläser. Mit ihrem Organisationstalent und ihrer ständigen Hilfsbereitschaft war sie ein wichtiges Bindeglied für das ganze Team.

Ganz tief aus dem Herzen kommt ein aufrichtiger Dank an meine Eltern. Ohne Ihre für Sie nicht immer einfache Unterstützung hätte ich meinen bisherigen Weg nicht gehen können!

Ebenso danke ich meiner Frau Christine für Ihre Geduld und die Hilfestellung bei der Behebung meiner orthographischen Schwächen.

Schließlich geht mein Dank an meinen ersten Mentor Herrn Dr. rer. soc. G. Hering (Universität Konstanz). Er hat mir erstmalig den Blick für wissenschaftliche Fragestellungen und Methoden geöffnet sowie mein Interesse für die Sportmedizin geweckt.

Ihm widme ich diese Arbeit.